

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

DU RÔLE DES ALCALINO-TERREUX DANS L'HÉMOLYSE PAR CERTAINS SÉRUMS FRAIS

par O. GENGOU (*) (**).

(Laboratoire d'Hygiène de l'Université de Bruxelles
[Directeur : professeur M. MILLET])

Nombreux sont les auteurs qui se sont efforcés de préciser le rôle joué par les sels alcalino-terreux dans la lyse subie sous l'action des sérums frais par les hématies sensibilisées.

Bon nombre d'entre eux admettent que le calcium et le magnésium y ont une participation essentielle (Mayer, Croft et Gray [14]).

Certains cependant ont prétendu n'avoir pu la mettre en évidence (Quick [15]). Les uns (Gordon, Whitehead et Wormall [5], Waldsworth, Maltaner et Maltaner [19]) ont admis une relation entre le pouvoir lytique des sérums et leur teneur en Ca associé aux protéines. Nous-même [4 a, b, c, d] avons consacré à cette question plusieurs mémoires, sans pouvoir aboutir à une conclusion positive.

La plupart des expérimentateurs ont eu recours, dans ces recherches, au sérum de cobaye, en raison de son remarquable pouvoir hémolytique. Ils ont montré que la dialyse prolongée de ce sérum, de même que son traitement par un échangeur d'ions, tel que l'amberlite INC-50, ne le prive pas de son pouvoir hémolytique. Beaucoup d'entre eux en ont conclu logiquement, en

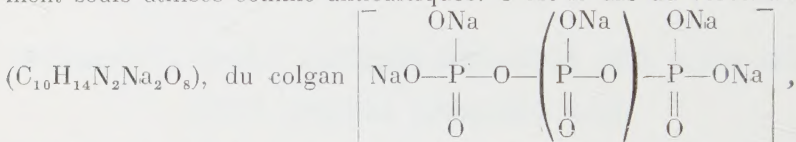
(*) Ce mémoire représente l'un des derniers travaux du professeur Gengou. Il était presque complètement rédigé au moment de la mort de son auteur.

(**) Manuscrit reçu le 21 juillet 1958.

apparence du moins, que les alcalino-terreux ne participent pas à l'hémolyse alexique.

D'autres ont cependant fait observer que la dissolution des hématies par le sérum de cobaye ne réclame que des traces d'alcalino-terreux, échappant à la soustraction par la dialyse ou par l'amberlite. Pour Mayer, Osler, Bier et Heidelberger [12], il reste, dans 5 ml de sérum, après une dialyse d'un jour contre 780 volumes de véronal, 6 μg de Ca et 3 μg de Mg/ml. Ils ont expliqué de la sorte la persistance du pouvoir hémolytique.

Mais divers corps organiques ont, depuis peu, enrichi la liste des anions (NaFl, oxalate potassique, citrate sodique) précédemment seuls utilisés comme anticalciques. C'est le cas du versénate



du tetron $[\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7]$ (1), ainsi que de la liquémine, principe actif de l'héparine. Pour certains auteurs (Gordon et Atkin [6]), ces corps, comme le versénate, le colgan, sont capables d'enlever au sérum les traces d'alcalino-terreux qui résistent à l'extraction par les citrates, etc.

I. — EXPÉRIENCES UTILISANT LE SÉRUM DE COBAYE.

Dans l'espoir de priver le sérum de cobaye de son pouvoir hémolytique, nous l'avons soumis *successivement* à l'action de l'amberlite INC-50, du versénate et de la dialyse.

EXPÉRIENCE 1. — Le sérum est agité, à trois reprises consécutives, chaque fois pendant dix minutes avec 20 cg (par millilitre) d'amberlite INC-50. Il est ensuite dilué au 1/10 par addition d'eau physiologique également traitée par l'amberlite (2).

(1) Ces indications nous ont été fournies par la firme Pugh et Co (chemicals), qui nous a également adressé gratuitement les échantillons nécessaires à ces recherches. Nous l'en remercions sincèrement.

(2) Ce traitement nous a paru d'autant plus indiqué, que les flacons de NaCl (Merck) ne portant que 100 g de sel contiennent 0,0041 p. 100 d'alcalino-terreux.

Des solutions à 18 p. 100 de ce sel dans 300 ml d'eau bidistillée ou tridistillée sont soumises à l'action de 4 g d'amberlite. Leur teneur en alcalino-terreux est ensuite recherchée selon les indications de Fischer : *Standardized procedures for spectrophotometric chemistry*, 10 — a 3 (calcium). M. H. Bastenier, qui a fait cette recherche, n'a trouvé aucune différence entre les deux solutions. Nous sommes heureux de lui exprimer nos sincères remerciements.

Ces solutions servent enfin, par dilution avec de l'eau bidistillée ou tridistillée, à la préparation de l'eau physiologique utilisée dans les expériences.

Le taux de versénate nécessaire à l'inhibition complète de toute hémolyse, à 37°, en une heure, de 0,05 ml de globules sensibilisés de mouton par 0,16 ml de ce sérum dilué, est de 0,1 ml M/2 000, le volume total étant de 1 ml.

Quatre tubes à centrifuger (A, A', B, B') contenant, chacun, 0,6 ml de globules sensibilisés, sont centrifugés de façon à ne conserver que le sédiment hématique ; deux autres (E, E') reçoivent de l'eau physiologique amberlitée en volume égal à ce sédiment.

On complète comme suit le contenu des tubes A, B, E :

A	B	E
Sédiment de 0,6 ml glob. sens.	Sédiment de 0,6 ml glob. sens.	Eau phys. = vol. sédim., 0,45 ml
Eau phys. tridist.-amb., 2,72 ml	Eau phys. bidist.-amb., 2,72 ml	Eau phys. tridist.-amb., 1,72 ml
Versénate M/2000 = 4 ml (3)	Versénate M/2000 = 4 ml	Versénate M/2000 = 4 ml (3)
Alexine cobaye, amberlite, 1,28 ml	Alexine cobaye, amberlite, 1,28 ml	Alexine cobaye, amberlite, 1,28 ml
10	10	40

Après un séjour de deux heures à 37°, les liquides centrifugés et incolores sont transvasés dans les trois tubes A' B', E' contenant respectivement un sédiment globulaire identique à A et B (A' et B') ou un volume d'eau physiologique amberlitée identique à celui de E (E').

Après un séjour de deux heures à 37°, ne déterminant pas d'hémolyse, on met en dialyse (4), pendant deux jours, à + 2°, 5 ml de chacun des liquides. La dialyse se fait en sacs de collodion, chacun d'eux plongeant dans 2 l d'eau physiologique amberlitée, bidistillée ou tridistillée suivant les cas, et renouvelée journellement. L'eau physiologique extérieure aux sacs est, en outre, additionnée, par millilitre, d'une dose de versénate M/2 000 égale à 1/20 de la quantité minimale inhibante de ce produit.

Les liquides A', B', E', non utilisés dans la dialyse, sont conservés comme témoins non dialysés (A'', B'', E'').

La dialyse terminée, on apprécie le pouvoir lytique de tous les liquides, par addition de 0,05 globules sensibilisés à des quantités décroissantes de chacun d'eux, le volume total étant toujours complété à 1 ml par de l'eau physiologique amberlitée bidistillée ou tridistillée.

Les trois liquides dialysés A', B', E' se comportent de même, l'hémolyse passant de 100 p. 100 à 50 p. 100 au fur et à mesure que décroît le liquide dialysé.

Aucune hémolyse ne se produit naturellement dans les liquides A'', B'', E''.

La conclusion que *semble* imposer cette expérience est que les sels alcalino-terreux n'interviennent pas dans l'hémolyse par l'alexine de cobaye.

(3) La dose minimale de versénate M/2 000 inhibant toute lyse globulaire en deux heures à 37° par 0,16 ml d'alexine de cobaye amberlitée au 1/10 est de 0,1 ml. Les tubes A, B, E en contiennent, par millilitre, une dose quintuple, que l'on multiplie en outre par 8, étant donné le volume total du contenu des tubes.

(4) Cette épreuve n'est évidemment possible que si les complexogènes inhibants forment avec les sels alcalino-terreux persistant dans le sérum dilué, des chélates susceptibles de dialyse. Nous avons vérifié qu'il en est bien ainsi pour le citrate, versénate, colgan et tetron.

Il en est de même des deux essais suivants, variantes de l'expérience I.

EXPÉRIENCE II. — 1° Le premier d'entre eux a pour but de rechercher si l'on peut inhiber plusieurs fois de suite, par exemple par le versénate, l'alexine de cobaye traitée par l'amberlite, l'inhibant étant éliminé par la dialyse avant qu'il exerce à nouveau son action.

Traitons de l'alexine de cobaye par l'amberlite (voir plus haut). Diluons-la au 1/10 par de l'eau physiologique amberlitée et préparons les deux mélanges suivants :

A	B
Alexine amberlitée, 7 ml (= 70 doses minim.)	Alexine amberlitée
hémol. de 0,1 ml $\frac{\text{alexine}}{10}$	$\frac{\quad}{10}$ 4,5 ml
Eau physiologique amberlitée, 60,9 ml	Eau phys. amb., 40,5 ml
Versénate M/40 2,1 ml (= 70 doses égales à 10 quantités minimum inhibantes)	

Distribuons dans trois sacs de collodion un même volume (15 ml) du liquide A, soumettons-les à la dialyse : I. Contre 1 l d'eau physiologique amberlitée ; II. Contre 1 l de la même eau additionnée, par millilitre, du 1/20 de la dose de versénate minimale inhibante ; III. Contre 1 l de la même eau additionnée par millilitre du 1/5 de la même dose.

Deux autres sacs reçoivent 15 ml du liquide B et sont mis en dialyse (V = témoin de I ; VI = témoin de III) respectivement contre 1 l des mêmes liquides.

Le reste du liquide A, non dialysé, sert de témoin aux liquides dialysés (IV).

Les liquides extérieurs sont renouvelés journellement.

Après deux jours de dialyse, 1 ml de chacun des liquides I à VI est additionné de 0,05 ml de globules sensibilisés et mis à 37°. Après une heure, l'hémolyse est totale dans les tubes I à III, V et VI, nulle en IV.

Les liquides dialysés restants sont jaugés et additionnés d'une quantité de versénate ramenant le titre de celui-ci, par millilitre, à dix fois la dose minimale inhibante. Prolongée pendant deux jours, la dialyse donne le même résultat.

On la poursuit encore pendant deux jours, après avoir ramené à son taux initial le titre (dix fois inhibant) du versénate des tubes I à III. Au sixième jour, l'épreuve hémostatique de 1 ml des divers liquides donne les résultats suivants :

LIQUIDE I	LIQUIDE II	LIQUIDE III	LIQUIDE IV	LIQUIDE V	LIQUIDE VI
Hémolyse totale	Hémolyse nette	Hémolyse nulle (5)	Hémolyse nulle	Hémolyse nette	Hémolyse nette

(5) L'absence d'hémolyse par le liquide A, le sixième jour (tube III), nous semble pouvoir être attribuée à l'action nocive qu'exerce sur l'alexine le versénate qui, dans cet essai, a été amené trois fois de suite à une concentration particulièrement élevée. Levine et ses collaborateurs [8] ont signalé la même action de ce produit.

Il est donc possible de produire deux à trois fois de suite par le versénate l'inhibition de l'activité hémolytique de l'alexine de cobaye, appauvrie en alcalino-terreux par l'amberlite, et de lui restituer son pouvoir moyennant l'éloignement, grâce à la dialyse, du corps inhibant.

2° On sait que l'hémolyse alexique est inhibée non seulement par certains anions, mais aussi par des cations, dont plusieurs ont, au contraire, la réputation de la favoriser quand ils sont employés à dose plus faible.

C'est notamment le cas du calcium [4 e]. On peut donc chercher à déterminer quelle est, par rapport au Ca ajouté et inhibant, l'importance de la quantité du Ca que, d'après certains auteurs, l'amberlite laisse inabsorbé dans l'alexine soumise à son action. On peut aussi rechercher si la dialyse permet le rétablissement de l'hémolyse.

De l'alexine de cobaye amberlitée, puis diluée à 1/5, est additionnée, pour 2,5 ml $\frac{\text{d'alexine-amb.}}{5}$ de 15 ml d'eau physiologique amberlitée et de 7,5 ml de solution de CaCl_2 isotonique à NaCl 9 p. 1 000. De ce mélange, on distribue 20 ml dans deux dialyseurs (A, B), le reste devant servir de témoin (C).

On dilue d'autre part 1,5 ml $\frac{\text{d'alexine-amb.}}{5}$ dans 13,5 ml d'eau physiologique amberlitée ; 10 ml en sont introduits dans un dialyseur (D), le reste servant de témoin (E).

Après deux jours de dialyse au cours desquels on renouvelle les 5 l d'eau physiologique amberlitée extérieure aux sacs, on détermine le pouvoir hémolytique des liquides dialysés et des témoins. A des doses décroissantes de chacun d'eux, on ajoute 0,05 ml de globules sensibilisés et on amène partout le volume à 1 ml. Les résultats observés sont rapportés dans le tableau I.

TABLEAU I.

	1 ml	0,8 ml	0,65 ml	0,5 ml	0,4 ml	0,3 ml
Liq. A	H.c.	H.p.p.c.	H. tr. nette	H. traces	H.O	H.O
" B	H.c.	H.c.	H.c.	H. nette	H. traces	H.O
" C	H.O	H.O	H.O	H.O		
" D	H.c.	H.p.p.c.	H. tr. faible	H. traces	H.O	H.O
" E	H.c.	H.c.	H.p.c.	H.p.c.	H.traces	H.O

Or, les liquides A et B contenaient, par millilitre, 0,0137 g de CaCl_2 , soit 4 600 μg de Ca introduits intentionnellement, ainsi que 0,1 ml $\frac{\text{d'alexine-amb.}}{5}$. Si l'on admet que l'amberlite laisse, non

absorbé, $\pm 1 \mu\text{g}$ de Ca par millilitre (6), $0,1 \text{ ml } \frac{\text{d'alexine-amb.}}{5}$ contenait $0,02 \mu\text{g}$ de Ca introduit par le sérum.

$4\,600 \mu\text{g}$ de Ca introduits intentionnellement dans les tubes A et B ont donc dialysé, au point que le liquide est redevenu hémolytique. On a peine à admettre que la dialyse n'ait pu parfaire son action en éliminant $4\,600,02 \mu\text{g}$.

Ce résultat pourrait s'expliquer de deux façons : ou bien l'hémolyse par l'alexine de cobaye ne réclame pas le concours de Ca dialysable, ou bien le calcium qui lui est nécessaire se trouve sous une forme échappant à la dialyse. Certains auteurs [5] ont d'ailleurs émis autrefois cette dernière opinion à titre d'hypothèse.

EXPÉRIENCE III. — Une expérience, identique à la précédente, montre que l'alexine de cobaye, inhibée par une dose suffisante de MgCl_2 , redevient hémolytique par la dialyse.

Les recherches effectuées avec l'alexine de cobaye et rapportées ci-dessus *semblent* donc démontrer que l'hémolyse qu'elle occasionne ne réclame pas le concours des alcalino-terreux.

Mais on sait, d'autre part, que divers auteurs [8] ont apporté, par des recherches très précises, des arguments en faveur de la thèse adverse, à savoir : la nécessité, pour que l'hémolyse survienne, de la présence de Ca et de Mg dans les milieux contenant cette alexine comme agent actif.

Il convient donc d'être d'autant plus prudent dans ses conclusions, que l'action anti-hémolytique utilisée plus haut ne paraît pas être une propriété commune à *tous* les corps capables de former des chélates. Ces corps se divisent, en effet, en deux groupes (7) : l'un comprenant les complexogènes susceptibles d'entrer en union avec les alcalino-terreux, l'autre renfermant les complexogènes dont le pouvoir d'association s'arrête aux métaux lourds.

Or, parmi tous ces corps, seuls sont susceptibles d'inhiber l'alexine (de même que NaFl , l'oxalate potassique) le citrate sodique, le versénate, le colgan, le tétroon et la liquémine, qui en constituent le premier groupe. Ils sont aussi en mesure de modifier la structure cristalline de corps comme le BaSO_4 . Sous leur influence, ainsi que nous l'avons signalé antérieurement [4 d], le BaSO_4 , formé en leur présence, n'a pas l'apparence de cristaux

(6) Renseignement fourni par M^{lle} Lacourt (Département de Microchimie de la Faculté des Sciences), que je remercie très vivement.

(7) Nous devons ce renseignement à l'amabilité de notre éminent collègue, le professeur Z. Bacq (Liège), auquel nous adressons nos vifs remerciements.

ayant l'aspect de quatre feuilles de fougère disposées en croix [4 d], mais se présente sous la forme de petits globes dont les dimensions et la réfringence diminuent au fur et à mesure que s'accroît la teneur du milieu en complexogène. Ils sont aussi capables, ainsi que nous venons de le voir, de former avec les alcalino-terreux des combinaisons ayant l'allure de solutions vraies et dialysables. Citrate, versénate, colgan, tetron, liquémine sont en somme susceptibles de participer aux phénomènes d'adhésion moléculaire, voire de se substituer à l'adhésion d'autres corps.

Par contre, les complexogènes, dont le pouvoir de chélation s'arrête aux métaux lourds (1-2-propane-diamine, cystéamine, B captan, 1-2-dipyridyl), n'inhibent pas l'hémolyse alexique, de même qu'ils ne dispersent pas les suspensions de BaSO_4 et qu'ils ne forment pas des solutions apparemment vraies d'oxalate calcique.

Ces faits ne doivent pas être perdus de vue dans l'interprétation des résultats expérimentaux rapportés précédemment.

II. — EXPÉRIENCE UTILISANT L'AUXILYSINE.

(Sérum de cobaye 55° + alexine de cheval
ou [équivalent] sérum de cobaye 55° + alexine de cobaye H_3N .)

Nous avons montré précédemment [4 b] le pouvoir lytique qu'exerce sur les globules sensibilisés de mouton un mélange de sérum de cobaye 55° et d'alexine de cheval, alors qu'isolément ces deux facteurs en sont dépourvus. Comme d'autres auteurs [10], nous avons appelé ce mélange auxilysine.

Ce fait s'explique depuis que Ferrata [3], Gengou [4 c], etc. ont montré que l'alexine est en réalité un mélange de plusieurs facteurs normalement présents dans les sérums. On sait aussi que la richesse de ceux-ci en ces différents facteurs varie suivant les espèces animales. Le sérum de cobaye est riche en facteurs C'1, C'2, C'3 et surtout en facteur C'4 ; le sérum de cheval, pourvu de facteurs C'1 et C'3, est pauvre en facteurs C'2 et C'4.

Rappelons que dans le sérum de mammifères, les facteurs C'1, C'2 sont thermolabiles, tandis que C'3 et C'4 sont considérés comme thermostables. Le facteur C'3 peut être inhibé par le zymosan, et le facteur C'4 moyennant l'addition de H_3N M/6,5 agissant pendant soixante-quinze minutes à 37° et neutralisée ensuite par un même volume de HCl M/6,5.

EXPÉRIENCE. — Le sérum de cobaye inactivé à 55° contient donc uniquement C'3 et C'4, tandis que le sérum frais de cheval apporte C'1, C'2, C'3. Ces facteurs sont accompagnés dans les deux cas, des éléments salins susceptibles d'influencer l'hémolyse. Leur mélange est hémolytique.

On peut y remplacer le sérum-amberlité H_3N de cheval par le sérum-amberlité H_3N de cobaye.

Par contre, le pouvoir hémolytique semble en disparaître si l'on traite au préalable par l'amberlite INC-50 (20 cg/ml) chacun des deux constituants organiques, ainsi qu'on le voit par l'expérience suivante :

A		B	
Sérum cob. non-amb. 55°	0,4 ml	Alexine cob. amb. 55°	0,4 ml
Eau phys. amb.	0,75 —	Eau phys. amb.	0,75 —
Sérum cob. non-amb. H_3N	0,15 —	Sérum cob. amb. H_3N	0,15 —
Globules sensibilisés	0,05 —	Globules sensibilisés.	0,05 —
Après 45 min. : H. = 90 %		Après 45 min. : H. = 0 %	

L'amberlite a donc, semble-t-il, supprimé l'action lytique du mélange, ce qu'on pourrait attribuer à l'extraction des alcalino-terreux, jugés dès lors comme essentiels dans l'hémolyse.

S'il en était réellement ainsi, celle-ci devrait encore faire défaut, quelle que soit la quantité des deux sérums employés. Portons, pour chacun d'eux, à 0,3 ml la quantité agissant dans un volume de 1 ml, à 37° ; nous obtenons, après quarante-cinq minutes, une hémolyse de ± 45 p. 100.

L'expérience laisse donc persister le doute : ou bien le sérum de cobaye est capable, à dose suffisante, d'hémolyser, quoique privé d'alcalino-terreux, les globules sensibilisés de mouton, ou bien l'amberlite y laisse persister une quantité de ces sels permettant que son action lytique soit perceptible à forte dose.

III. — EXPÉRIENCES UTILISANT LE SÉRUM DE CHEVAL.

Contrairement à l'alexine de cobaye, l'alexine de cheval est très peu hémolytique pour les globules sensibilisés de mouton. On le comprend dans une certaine mesure grâce aux tableaux de Hegedius et Greiner [7] et de Rice et Crowson [16], qui ont mentionné, tous deux, en unités arbitraires, la composition de ces sérums.

Quelle que soit la valeur absolue des unités arbitraires utilisées par ces auteurs, leurs recherches indiquent que l'alexine de cheval pourrait devoir son faible pouvoir hémolytique à sa pauvreté en certains constituants (C'2, C'4). Toutefois les partisans de la nécessité de l'intervention des alcalino-terreux dans la dissolution alexique des hématies pourraient prétendre que son inaction résulte de son insuffisance en sels alcalino-terreux, notamment en Ca et Mg.

EXPÉRIENCE. — Pour nous en assurer, privons par l'amberlite (3 agitations de 1 ml de sérum avec 20 cg d'amberlite) le sérum de cheval (8)

(8) Je remercie vivement M. le professeur P. Bordet, Directeur de l'Institut Pasteur de Bruxelles, d'avoir autorisé M. Koopmansch, vétérinaire de l'Institut, à me fournir régulièrement du sérum de cheval, ce qu'il a fait avec une extrême obligeance.

de ses alcalino-terreux ; faisons ensuite agir sur 0,05 ml de globules sensibilisés l'alexine ainsi traitée, additionnée ou non de quantités croissantes de CaCl_2 et MgCl_2 .

Tableau de Rice et Crowson

	C'1	C'1	C'2	C'3	C'4
Homme	100	4.000	225	500	1.750
Cobaye	625	3.750	750	1.000	8.000
Hamster	425	1.750	210	325	625
Porc	153	1.720	120	3.670	95
Cheval	< 10	500	18	125	< 10
Bœuf	15	500	10	175	< 10
Oiseaux	75	0	0	0	0

Tableau de Hegedius et Greiner

	C'1	C'2	C'3	C'4
	400	80	500	1.400
	200	800	400	12.500
	—	—	—	—
	800	100	12.500	50
	3.200	0	20	10
	1.400	0	100	0
	—	—	—	—
Lapin	100	25	200	40
Rot	400	100	100	800
Chien	100	50	200	100
Mouton	1.600	0	2	0
Loir	1.600	0	25	0

Quatre séries de tubes reçoivent des doses croissantes de CaCl_2 et de MgCl_2 , soit 0 ml, soit 0,1 à 0,3 ml M/100 à 0,1 ml M/10. On y ajoute de 0,05 à 0,3 ml d'alexine de cheval amberlitée, ainsi que 0,05 ml de globules sensibilisés. On complète le volume total à 1 ml par de l'eau physiologique amberlitée. Après un séjour d'une heure à 37°, on transcrit les résultats (tableau II).

TABLEAU II.

CaCl_2	MgCl_2	Addition de 0,05 ml alexine-amberlite	Addition de 0,1 ml alexine-amberlite	Addition de 0,2 ml alexine-amberlite	Addition de 0,3 ml alexine-amberlite
0	0	H: 0 %	H: 0 %	H: 0 %	H: 0 %
0,1 ml M/10.000	0,1 ml M/10.000	H: 0 - < 5 %	H: 0 - < 5 %	H: 15 %	H: 10 %
0,3 " "	0,3 " "	H: 0 - < 5 %	H: 0 - < 5 %	H: 15 %	H: 20 %
0,1 " M/1.000	0,1 " M/1.000	H: 0 - < 5 %	H: 0 - < 5 %	H: 20 %	H: 20 %
0,3 " "	0,3 " "	H: 0 - < 5 %	H: 0 - < 5 %	H: 20 %	H: 27 %
0,1 " M/100	0,1 " M/100	H: 0 - < 5 %	H: 20 %	H: 40 %	H: 40 %
0,3 " "	0,3 " "	H: 0 - < 5 %	H: 20 %	H: 40 %	H: 50 %
0,1 " M/10	0,1 " M/10	H: 0 - < 5 %	H: 20 %	H: 50 %	H: 45 %

Même à la dose de 0,3 ml, l'alexine de cheval, appauvrie en alcalino-terreux confère au contraire, à une quantité plus faible de cette alexine (0,1 à 0,2 ml) un pouvoir lytique net (de 20 à 50 p. 100).

Le sérum amberlité de cheval paraît donc plus propice que le sérum amberlité de cobaye à la démonstration du caractère essentiel des alcalino-terreux dans l'hémolyse alexique.

Recherchons également quel est de ces deux cations (Ca, Mg) celui qui paraît essentiel, c'est-à-dire nécessaire à la diffusion de l'hémoglobine hors du stroma globulaire.

Ajoutons, à des doses fixes d'alexine amberlitée (0,1 à 0,3 ml), des doses croissantes de CaCl_2 ou de MgCl_2 . Introduisons dans chaque tube 0,05 ml de globules sensibilisés et portons le contenu de chaque tube à 1 ml par de l'eau physiologique amberlitée. On observe, après séjour de une heure à 37°, les résultats rapportés dans le tableau III.

TABLEAU III.

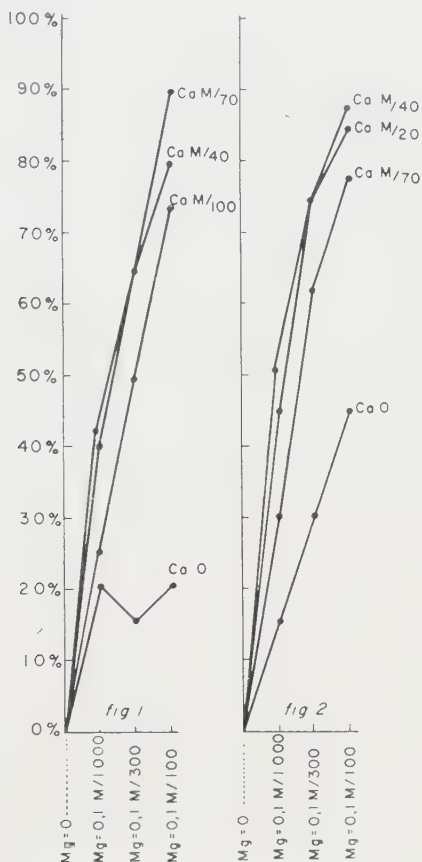
CaCl_2	0,1 à 0,3 ml alexine amberlite	MgCl_2	0,1 ml alexine- amberlite	0,2 ml alexine- amberlite	0,3 ml alexine- amberlite
0 ml	H: 0 %	0 ml	H: 0 %	H: 0 %	H: 0 %
0,1 " M/10 000	H: 0 %	0,1 " M/10 000	H: 0 %	H: 25 %	H: 40 %
0,3 " "	"	0,3 " "	H: 0 %	H: 25 %	H: 40 %
0,1 " M/1 000	"	0,1 " M/1 000	H: 15 %	H: 27 %	H: 40 %
0,3 " "	"	0,3 " "	H: 30 %	H: 45 %	H: 53 %
0,1 " M/100	"	0,1 " M/100	H: 60 %	H: 45 %	H: 67 %
0,3 " "	"	0,3 " "	H: 54 %	—	—
0,1 " M/10	"	0,1 " M/10	H: 40 %	—	—

C'est donc Mg qui provoque l'expulsion de l'hémoglobine hors du globule, ainsi que nous l'ont appris depuis longtemps Cernovodeanu et Henri [2], et comme l'ont encore affirmé récemment, pour l'alexine de cobaye, Levine, Cowan, Osler et Mayer [8].

S'ensuit-il que, contrairement à l'opinion de ces derniers, CaCl_2 ne joue aucun rôle dans l'hémolyse alexique ? Ils estiment avoir démontré que CaCl_2 est nécessaire à la fixation de l'alexine de cobaye sur les globules sensibilisés, cette action pouvant s'exercer même à froid. Au contraire, d'après eux, l'action de MgCl_2 , nécessaire à la sortie de l'hémoglobine hors du stroma, ne se manifeste qu'à une température assez élevée, dont l'optimum est à 37°.

Il faut donc rechercher si la fixation de l'alexine sur les globules par CaCl_2 persiste assez longtemps pour qu'on puisse ensuite la mettre en évidence après lavage des hématies, puis retrouver celles-ci aptes à subir l'action de MgCl_2 .

Or, il n'en est rien (9) : quelle que soit la dose initialement utilisée d'alexine amberlitée de cheval, de même que le taux utilisé de CaCl_2 et la durée de leur action, nous n'avons jamais trouvé, lorsque *toute l'alexine* a été mise hors de cause, les



globules ainsi traités plus aptes à subir l'hémolyse par MgCl_2 que ne le sont les globules témoins.

On peut néanmoins démontrer l'existence de l'action de CaCl_2 , à la condition que les globules lavés, après l'action de CaCl_2 ,

(9) Levine, Cowan, Osler et Mayer signalent cependant que les globules, ainsi soumis à l'action du sérum de cobaye et de calcium, peuvent subir un lavage à l'eau physiologique [8] et s'hémolyser ensuite sous l'action de MgCl_2 .

soient soumis, en présence du sel magnésien, à l'influence d'une petite quantité d'alexine amberlitée de cheval.

EXPÉRIENCE. — Préparons 4 mélanges A, B, C, D, chacun d'eux contenant le même volume d'alexine amberlitée (16,8 ml) de cheval, d'eau physiologique amberlitée (19,6 ml) et de globules rouges sensibilisés (2,8 ml). Ajoutons en A 5,6 ml d'eau physiologique amberlitée et, en B, C, D, respectivement le même volume de CaCl_2 M/100, M/70, M/40. Les tubes sont gardés seize heures à 2°.

De chacun d'eux, on distribue le lendemain, à 2°, 0,8 ml dans une série de 16 tubes, qu'on centrifuge et dont on décante les liquides. Aux sédiments globulaires, on ajoute 0,8 ml d'eau physiologique amberlitée et 0,1 ml de sérum amberlité de cheval.

Les diverses séries reçoivent enfin, sous un même volume (0,1 ml) des doses croissantes de MgCl_2 .

Comme on peut le voir par la figure 1 qui résume les résultats observés après une heure à 37°, l'action de CaCl_2 est évidente.

Or cette action est assez persistante.

Soumettons à deux lavages consécutifs à l'eau physiologique amberlitée des globules, qui ont été au contact, à 2°, pendant une nuit, d'une dose suffisante (0,3 ml) d'alexine amberlitée de cheval et d'une quantité appropriée de CaCl_2 . Ajoutons-leur des quantités croissantes de MgCl_2 sous volume constant, ainsi qu'une petite quantité (0,1 ml) d'alexine amberlitée de cheval.

Complétons leur volume à 1 ml par de l'eau physiologique amberlitée. Après un séjour d'une heure à 37°, nous pouvons transcrire, dans la figure 2, les résultats où l'action de CaCl_2 , décelée par MgCl_2 , est encore fort manifeste.

DISCUSSION.

Les observations consignées dans cette note *semblent* indiquer que, dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placé, les sérums de cobaye et de cheval se comportent différemment quant à l'action hémolytique de leurs alexines, d'abord appauvries par l'amberlite en alcalino-terreux, puis enrichies par l'addition de quantités connues de CaCl_2 et de MgCl_2 .

Mais ce n'est là qu'une apparence. Certains faits apportent, en effet, pour le sérum de cheval, la preuve directe du rôle essentiel joué, dans l'hémolyse, par les alcalino-terreux, tandis que, pour le sérum de cobaye, il faut se contenter de la preuve indirecte qu'on trouve dans l'action inhibante de l'un des deux groupes complexogènes.

Le sérum de cobaye, soumis même à plusieurs reprises à l'action d'un échangeur d'ions, tel que l'amberlite, au point qu'il est difficile d'y déceler les alcalino-terreux restants, demeure encore hémolytique. Il ne perd cette propriété que moyennant l'addition

ultérieure d'une quantité suffisante d'un *complexogène* susceptible de *chélater* les alcalino-terreux dans les conditions physiologiques. Cet état prend fin grâce à l'éloignement par la dialyse du chélate ainsi formé, le pouvoir lytique réapparaissant sans qu'il soit nécessaire d'enrichir le milieu en Ca ou en Mg.

D'après Levine, Cowan, Osler et Mayer [8], ces faits résultent de ce que l'amberlite ne peut réduire les alcalino-terreux du sérum de cobaye à un taux suffisamment bas, attendu que des traces de ces sels autorisent encore la fixation de son alexine sur les globules et l'hémolyse ultérieure.

D'après Pillemer, Blum, Pansky et Lepow [13], le traitement du sérum de cobaye par un volume égal d'amberlite pendant dix minutes, qui enlève 99,8 à 99,9 p. 100 des alcalino-terreux, y laisse en effet persister 5×10^{-6} M Ca et 1×10^{-6} M Mg, alors que le sérum ne perd qu'environ 50 p. 100 de son activité lytique (10). Aussi, tout en reconnaissant que les alcalino-terreux renforcent le pouvoir hémolytique de l'alexine de cobaye, ces auteurs ne paraissent-ils pas les considérer comme indispensables à l'exercice de ce pouvoir.

Ces faits peuvent s'expliquer si l'on admet, comme Levine et ses collaborateurs, la nécessité des alcalino-terreux dans la réalisation de l'hémolyse par le sérum de cobaye et, *en outre*, que des traces de ces sels suffisent dans ce cas à cet effet.

Le sérum de cheval, au contraire, perd, même employé à dose relativement élevée (0,3 ml), son pouvoir hémolytique par l'action d'un échangeur d'ions (amberlite). L'addition d'un sel calcique et d'un sel magnésien confère, par contre, à une quantité plus faible (0,1 ml) du sérum ainsi traité, un pouvoir hémolytique évident.

Il y a lieu de se demander si ces différences ne sont pas en rapport avec les constitutions attribuées à ces deux sérums : l'alexine de cobaye est riche en facteurs C'1, C'2, C'3 et particulièrement en facteur C'4 ; l'alexine de cheval, très peu hémolytique, est relativement pauvre en facteurs C'1, C'3 ; elle l'est particulièrement en facteurs C'2 et C'4.

Dans ces conditions, le besoin de ces deux sérums en alcalino-terreux, pour manifester une activité hémolytique, pourrait être très divers : l'alexine de cobaye, riche en facteurs C'2 et C'4, n'aurait besoin, à cette fin, que de très faibles quantités d'alcalino-terreux. C'est ce que signalent du reste divers auteurs, pour qui

(10) On connaît du reste d'autres exemples comparables ; Rubbo, Albert et Gibson [18] prétendent qu'une substance chimique purifiée à 99,99 p. 100 contient encore, par gramme, 6×10^{17} molécules étrangères ; ce serait, d'après eux, le cas du Co, dont certaines activités biologiques persistent à ces doses.

l'hémolyse par ce sérum ne réclame que des traces d'alcalino-terreux, au point que plusieurs estiment impossible d'en abaisser suffisamment le taux et de le priver ainsi de tout pouvoir lytique.

Au contraire, l'alexine de cheval, pauvre en facteurs C[']2 et C[']4, est très peu hémolytique ; elle ne peut y prétendre que moyennant un apport d'alcalino-terreux. Il doit donc être aisé de l'appauvrir suffisamment en ces derniers pour qu'elle perde toute action. En effet, une simple agitation de dix minutes avec 20 cg/ml d'amberlite lui enlève son pouvoir lytique, qu'une addition ultérieure d'alcalino-terreux lui restitue.

Si cette opinion, émise à titre d'hypothèse, est exacte, le sérum de cheval semble spécialement apte à démontrer que c'est $MgCl_2$ qui paraît être l'agent faisant diffuser du stroma globulaire l'hémoglobine qu'il contient (11), tandis que $CaCl_2$ semble avoir pour rôle de consolider la fixation de l'alexine sur le globule.

Il est probable que l'action de $CaCl_2$ est relativement réversible ; certains auteurs la considèrent d'ailleurs comme faible. Ce fait explique peut-être que $MgCl_2$ soit sans action sur des globules convenablement lavés de toute alexine après l'entrée en jeu de $CaCl_2$. Nous avons vu, en effet, que pour que s'exerce l'activité de $MgCl_2$, il faut que le milieu contienne une petite quantité (0,05 à 0,1 ml) d'alexine amberlite de cheval, dont il provoque l'action lytique.

Il paraît vraisemblable que Mg est nécessaire à l'action de la fraction albumine de l'alexine.

Peut-être l'hypothèse énoncée plus haut pourra-t-elle être vérifiée par des recherches relatives aux rapports existant éventuellement entre le pouvoir lytique des alexines de divers animaux, leur constitution et le caractère, essentiel ou non, d'éléments salins.

RÉSUMÉ.

L'auteur estime avoir montré que le sérum de cobaye d'une part, de cheval de l'autre, *paraissent* se comporter différemment quant à la nécessité des alcalino-terreux dans l'exercice de leur action hémolytique.

Il émet l'hypothèse que cette différence d'action n'est qu'apparente, qu'elle pourrait être en relation avec la constitution attribuée à ces deux alexines, et que l'étude du complément des diverses espèces animales serait susceptible d'éclairer ce problème.

(11) Divers auteurs ont tendance à rapprocher cette action de l'influence que le Mg exerce dans certaines activités enzymatiques s'exerçant en milieu alcalin (Roche et Courtois [47], Bamman et Salzer [4]).

SUMMARY

THE ROLE OF ALKALIN-EARTHY METALS IN HEMOLYSIS INDUCED
BY FRESH SERA.

Guinea-pig and horse sera seem to behave differently as to their requirements in alkaalin-earthly metals for their hemolytic activity.

The author suggests that this difference might be only apparent; it might be related to the constitution of the two alexins, and the study of complement in various animal species might solve this problem.

★ ★

Je remercie vivement M. le professeur M. Millet de la longue hospitalité qu'il m'a donnée dans son laboratoire et des facilités qu'il m'a accordées pour effectuer ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BAMMAN (E.) et SALZER (W.). *Biochem. Z.*, 1936, **286**, 147.
- [2] CERNOVODEANU (P.) et HENRI (V.). *Biol.*, 1906, **60**, 571.
- [3] FERRATA. *Berl. klin. Wschr.*, 1907, n° 13.
- [4] GENGOU (O.). a) *Arch. intern. Physiol.*, 1908, **7**, 1; b) *Centralbl. Bakt. I*, 1909, **52**, n° 4; c) *Z. Immunitätsf.*, 1911, **9**, 3; d) *Arch. intern. Pharm.*, 1948, **77**, 387; e) *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 241.
- [5] GORDON (J.), WHITEHEAD et WORMALL. *Biochem. J.*, 1926, **20**, 1028.
- [6] GORDON (J.) et ATKIN (W. R.). *Brit. J. exp. Path.*, 1941, **22**, 226.
- [7] HEGEDIUS (A.) et GREINER (H.) [cité d'après DOERR (B.): *Das Komplement II*].
- [8] LÉVINE (L.), COWAN (K. M.), OSLER (A. G.), MAYER (M. M.). *J. Immunol.*, 1953, **71**, 359.
- [9] LEPOW, WURTZ et RATSOFF. *J. exp. Med.*, 1953, **97**, 573; **98**, 277.
- [10] MANWORING. *Centralbl. Bakt.*, **41**, 455 et **45**, 55.
- [11] MAYER (M.), CROFT (C. C.) et GRAY (M. M.). *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 487.
- [12] MAYER (M.), OSLER (A. G.), BIER (O. G.) et HEIDELBERGER (M.). *J. exp. Med.*, 1946, **84**.
- [13] PILLEMER (L.), BLUM (L.), PANSKY (J.) et LEPOW (H.). *J. Immunol.*, 1953, **71**, 331.
- [14] LEPOW, WURTZ, RATSOFF et PILLEMER. *J. Immunol.*, 1954, **73**, 146.
- [15] QUICK (A.). *J. Immunol.*, 1935, **29**, 87.
- [16] RICE (C.) et CROWSON (C. N.). *J. Immunol.*, 1950, **65**, 21 (cité d'après J.-P. SOULIER. *Rev. Franç. Etudes clin. et biol.*, 1956, **1**, 443).
- [17] ROCHE (J.) et COURTOIS (J.). *Exposés annuels de biochimie médicale*, **4**, 219.
- [18] RUBBO (S. D.), ALBERT (A.) et GIBSON (M. I.). *Brit. J. exp. Path.*, 1950, **31**, 425.
- [19] WALDSWORTH (A.), MALTANER (F.) et MALTANER (E.). *J. Immunol.*, 1936, **30**, 417.

LE PHÉNOMÈNE D'ADAPTATION SPÉCIFIQUE DES ULTRAVIRUS EN FONCTION DE L'ÂGE DES ANIMAUX

par J. VERGE, A. PARAF et J. ASSO (*).

(Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, Alfort)

Les ultravirus semblent prendre depuis quelques années une place prépondérante dans les préoccupations des pathologistes, malgré la déconvenue née de l'inefficacité des antibiotiques à leur égard. L'un des obstacles majeurs rencontré dans leur étude tient au fait que seules certaines espèces sont sensibles à leur action pathogène.

En ces dernières années, des progrès considérables ont été réalisés soit par les techniques des cultures de tissus, soit par la recherche d'animaux de laboratoire rendus expérimentalement sensibles.

Notre exposé sera uniquement consacré à la seconde de ces méthodes : les études faites par la plupart des auteurs portent sur les moyens susceptibles de modifier expérimentalement la physiologie de l'hôte qui, ainsi, devient capable de permettre la multiplication du virus. Nous voudrions envisager le problème des relations hôte-virus d'un point de vue différent et montrer comment les variations physiologiques normales de l'animal inoculé peuvent, non seulement entraîner des modifications dans sa réceptivité, mais plus encore transformer les propriétés de l'ultravirus. *L'hôte n'est pas un support passif ; mais il transforme et « modèle » le virus* : à notre sens, lorsqu'on parle de son « adaptation » à un nouvel hôte, ce mot semble sous-entendre que seul le virus intervient dans les transformations de ses propriétés ; or, ce terme doit exprimer aussi les modifications imprimées par l'hôte à l'ultravirus. C'est cet aspect particulier des relations hôte-virus que nous envisagerons, en centrant notre étude plus particulièrement sur le rôle de l'âge dans « l'adaptation » des agents virulents.

(*) Manuscrit reçu le 20 août 1958.

Notre exposé comportera trois parties :

1° Une partie consacrée à une revue générale sur les travaux effectués à ce propos ;

2° Une partie relatant les résultats expérimentaux que nous avons obtenus, en étudiant les propriétés du virus aphteux se multipliant chez des lapins d'âges différents ;

3° Conclusions.

★
★ ★

PREMIÈRE PARTIE

Historique.

SENSIBILITÉ DES NOUVEAU-NÉS A DES ULTRAVIRUS NON PATHOGÈNES POUR LES ADULTES DE LA MÊME ESPÈCE.

Les propriétés essentielles des ultravirus résident dans les relations étroites qui les unissent à l'hôte infecté. Strictement biotopes, ils ne peuvent se multiplier qu'au sein d'une cellule vivante, propriété qui accompagne ou conditionne des tropismes plus étroits : un ultravirus possède généralement une électivité marquée pour un tissu donné et pour une ou quelques espèces animales, seules sensibles à son action pathogène.

Dans les conditions naturelles, rares sont les virus dont la virulence s'exerce à l'égard de nombreuses espèces animales : parmi eux citons surtout le virus rabique et les virus des méningo-encéphalo-myélites, c'est-à-dire des virus neurotropes. Or, l'on sait que le tissu nerveux est précisément celui qui possède la fixité la plus marquée, aussi bien pour l'espèce que pour l'individu au cours de son développement.

Au contraire, parmi les virus septicémiques, la plupart sont étroitement spécifiques, c'est-à-dire que seule une espèce animale ou un très petit nombre d'espèces sont sensibles à son action pathogène : le virus de la peste bovine n'atteint que les bovins, rarement les petits ruminants ; le virus de la peste porcine ne provoque la maladie que chez le porc ; le virus de la rougeole ne se multiplie que chez l'homme.

Dans les conditions expérimentales, de nombreux artifices ont été mis en œuvre pour obtenir la multiplication de certains ultravirus sur des espèces animales habituellement insensibles. Parmi ces artifices, l'un des plus remarquables est l'emploi d'animaux très jeunes, voire d'embryons, qui montrent une réceptivité s'étendant souvent à de très nombreux ultravirus. Dalldorf [1]

établit que les virus Coxsackie de l'homme sont susceptibles de se multiplier chez le souriceau nouveau-né. Skinner [2] obtient la culture du virus aphteux chez le souriceau âgé de moins de 8 jours. Le virus de l'avortement des juments est transmis par Doll [3] au hamster âgé de 3 jours. Le virus de la maladie de Newcastle est cultivé par Reagan [4] chez le jeune chaton ; Sinkovics [5] observe que ce virus « s'adapte » aisément au souriceau nouveau-né par inoculation intracrânienne alors que, dans les mêmes conditions, la souris adulte se montre réfractaire. Le virus de Carré est adapté par Gutierrez et Gorham [6] au souriceau nouveau-né. Pospisil et Brychtova [7] ont réussi la multiplication du virus ourlien chez le rat blanc nouveau-né, dont la sensibilité décroît de l'âge de 1 jour à l'âge de 16 jours : à ce moment, les rats ne sont plus réceptifs. Le virus de Sindbis, selon Reagan et ses collaborateurs [8], peut être transmis au hamster nouveau-né. Kaschula et ses collaborateurs [9] ont obtenu la multiplication du virus de l'influenza équine d'abord chez le hamster nouveau-né, puis chez le souriceau nouveau-né. En collaboration avec L. Dhennin et L. Dhennin [10], nous avons transmis les différents types de virus aphteux au lapereau âgé de moins de 8 jours.

Parfois le rôle de l'âge dans la sensibilité des animaux à l'action pathogène des ultravirus apparaît plus nuancé : Giroud et Marinesco [11], inoculant différentes souches de néo-rickettsies à des lots de lapins d'âges variés, observent une hépato-néphrite marquée chez les lapins nouveau-nés, beaucoup plus discrète chez les animaux âgés de 2 mois et chez les lapins adultes. Rowe et ses collaborateurs [12], au cours d'expériences portant sur la valeur immunisante du fibrome de Shope à l'égard de la myxomatose, ont noté que le virus de Shope, bien toléré par les animaux adultes chez lesquels le virus se multiplie sans signes cliniques, suscite la mort des lapins nouveau-nés.

Parfois il est nécessaire de s'adresser aux embryons pour obtenir la multiplication d'un virus habituellement non pathogène pour l'espèce animale choisie : Blanc et Bruneau [13], étudiant la sensibilité du lapin à l'action pathogène d'une souche de virus de la chorio-méningite, concluent de leurs expériences que, si le lapin adulte et le lapin nouveau-né s'infectent sans être malades, les embryons par contre, à condition de recevoir l'injection virulente entre le septième et le vingt-septième jour qui suivent la fécondation, sont tués par le virus ; la mort se produit d'autant plus rapidement que la gestation est moins avancée.

Il est cependant quelques cas exceptionnels où, contrairement à ce que nous avons vu jusqu'à présent, les jeunes animaux se montrent plus résistants que les adultes. C'est le cas des virus

poliomyélitiques, dont les trois types ont pu être « adaptés » à la souris adulte, alors que la transmission au souriceau nouveau-né n'a été réalisée que dans quelques rares cas avec le type Lansing [14, 15] ou avec le type Mahoney [16].

Nous ne saurions terminer ce rapide historique sans rappeler que de très nombreux virus, non pathogènes pour les oiseaux, ont pu être cultivés sur l'œuf embryonné de poule, montrant ainsi la particulière réceptivité des embryons.

Cette sensibilité des animaux âgés de moins de 8 jours semble assez générale chez les rongeurs : elle existe chez le lapin, le rat, la souris et le hamster. Une espèce semble y échapper : le cobaye. On peut alors se demander si la durée de l'état de réceptivité n'est pas inversement proportionnelle à la durée de la gestation ; en prenant comme base de référence la souris, le rat et le lapin (pour lesquels la durée de gestation est respectivement de dix-huit, vingt et un et vingt-huit jours), le cobaye (dont la durée de gestation est de soixante jours) ne présenterait pas cette période critique de huit jours, alors que chez le hamster, au contraire (durée de gestation seize jours seulement), cette période s'étendrait peut-être sur plus de huit jours. Chez les carnivores, elle est à déterminer, mais il est vraisemblable que, compte tenu des différentes durées de gestation et du degré de « maturité » des nouveau-nés, elle est plus longue, atteignant deux ou trois semaines. Quoi qu'il en soit, nous voyons que l'immunité naturelle n'est pas obligatoirement innée, elle est ici « acquise » en ce sens qu'elle n'apparaît qu'au cours du développement de l'individu, en relation vraisemblablement avec l'acquisition de certains équilibres neuro-hormonaux ou avec des modifications du métabolisme cellulaire [17].

Etudiant le phénomène de tolérance immunitaire chez le lapin [18, 19], nous sommes arrivés à la conclusion qu'en utilisant un antigène (albumine humaine) proche de certains constituants cellulaires de l'animal, on pouvait obtenir la tolérance dans 100 p. 100 des cas, si la première injection d'antigène est pratiquée dans les huit jours qui suivent la naissance ; réalisée après le huitième jour, l'injection suscite la synthèse des anticorps spécifiques. Ce délai n'est cependant pas absolu, en ce sens que certains lapins sont rendus tolérants à l'albumine humaine par une sensibilisation n'intervenant que vers le douzième ou le quatorzième jour après la naissance.

Si l'on rapproche cette observation de tout ce que nous venons de dire à propos de la sensibilité des nouveau-nés à l'égard de l'action pathogène des ultravirus, on peut se demander s'il n'existe pas une relation entre la synthèse des anticorps et la réceptivité à un agent pathogène relativement spécifique. Pour

percevoir cette relation éventuelle deux conditions sont nécessaires qui, toutes deux, sont des conditions « limites » :

1° User d'un antigène très proche de l'un des constituants cellulaires de l'organisme animal éprouvé : chez le lapin l'albumine de poule ne suscite pas le phénomène de tolérance immunitaire (Dubert, Paraf et Asso, expériences inédites). De la sorte on peut déterminer à quel moment l'organisme devient capable de « discerner » le motif antigénique nouveau (alors qu'avec un antigène très différent le nouveau-né répond immédiatement à la stimulation par la production d'anticorps). 2° Inoculer un virus auquel l'animal adulte est absolument réfractaire, sans même présenter d'infection inapparente, pour que l'on soit capable de juger d'un fait indiscutable : la multiplication du virus. Sans quoi l'on risque d'observer des réactions identiques qualitativement, différant seulement par leur intensité.

Si une telle relation existait véritablement entre ces deux phénomènes, on serait en droit de penser que l'on peut jeter un pont entre l'immunité acquise (mesurée par la production des anticorps) et l'immunité naturelle (caractérisée par la sensibilité à un ultravirus). En réalité, nous ne pouvons, à l'heure actuelle, apporter aucune preuve d'une telle parenté et nous pensons plutôt que le lien qui semble exister ici entre immunité acquise et immunité naturelle, tient à la subordination de ces deux phénomènes à un ensemble de réactions non spécifiques de l'organisme animal, dont la composante est représentée dans le cas particulier par l'âge de l'animal.

Il est possible que les synthèses protéiques subissent de profonds remaniements lorsque le lapin atteint l'âge de 8 jours, de sorte que les inducteurs du métabolisme protéique (probablement les acides désoxyribonucléiques) seraient, jusqu'à cette époque, assez « malléables ». Dans le cas de la tolérance immunitaire, ces inducteurs pourraient subir, de la part de l'antigène, des modifications de structure telles que cet antigène serait incorporé au métabolisme normal de l'hôte ; lors de l'inoculation d'un ultravirus, les métabolites protéiques seraient assez peu différenciés pour que l'ultravirus puisse les utiliser pour sa propre synthèse, ou bien la présence de l'ultravirus dans les cellules suffirait pour modifier les synthèses protéiques de l'hôte, qui lui fournirait alors les métabolites spécifiques indispensables.

Admettant que les réactions non spécifiques de l'organisme jouaient un rôle primordial aussi bien dans l'immunité naturelle que dans l'immunité acquise, nous nous sommes demandé si ces réactions ne conditionnaient pas à la fois, d'une part la multiplication et la répartition du virus dans l'organisme-hôte, d'autre part les propriétés biologiques intrinsèques de l'ultravirus caractérisées par ce que l'on nomme parfois qualités « d'adaptation »

de l'ultravirus. Pour pouvoir faire des observations valables, il est toujours nécessaire de simplifier au maximum les conditions expérimentales, en particulier d'obtenir que les réactions non spécifiques de l'organisme ne soient modifiées que par une action physiologique. C'est pourquoi nous avons prohibé toute injection de substance quelconque (hormonale par exemple), susceptible d'entraîner des modifications non physiologiques de l'hôte. Nous avons seulement étudié, dans notre deuxième partie, les modifications apportées aux propriétés biologiques du virus aphteux par passages successifs sur des animaux d'âge progressivement croissant. Nous aurions aussi bien pu prendre, comme autres exemples des modifications apportées aux propriétés d'un ultravirus, les passages successifs soit sur animaux de sexe différent, soit à la rigueur sur animaux ayant subi l'ablation d'une glande endocrine ou d'un centre nerveux végétatif.

DEUXIÈME PARTIE

Etude expérimentale.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DU VIRUS APHTEUX SE MULTIPLIANT CHEZ DES LAPINS D'ÂGES DIFFÉRENTS.

A. — *Protocole d'expérimentation.*

Le virus utilisé au départ provient de l'épithélium lingual de vache expérimentalement infectée de fièvre aphteuse avec la souche de type C Loupogne (1), mis en suspension dans du sérum physiologique tamponné à pH 7,6, à la concentration de 1/10.

Les lapins utilisés pour les passages du virus appartiennent à diverses lignées de race commune.

Les souriceaux qui servent aux différents titrages du virus aphteux sont de race pure (souche R. A. P.), inoculés toujours lorsqu'ils sont âgés de 4 ou 5 jours.

Les bovins sur lesquels sont pratiqués ces titrages de la virulence sont des animaux venant, pour la plupart, du Finistère (région pratiquement indemne de fièvre aphteuse), n'ayant jamais présenté les signes de la maladie et n'ayant jamais été vaccinés contre elle. Ces précautions indispensables sont prises pour que ces animaux présentent le maximum de sensibilité à l'égard de l'action pathogène du virus.

Le virus aphteux d'origine bovine est, au premier passage, inoculé à des lapins nouveau-nés de 2 à 6 jours, par voie intrapéritonéale. Les passages ultérieurs sont réalisés par l'inoculation d'une suspension de foie et de muscle (et à partir du soixante-dixième passage de muscle

(1) Souche isolée et identifiée par M. le Dr R. Willems, directeur du Laboratoire de Recherches de l'Etat à Uccle-Bruxelles.

seul) de lapereau mort après avoir présenté les symptômes de la maladie aphteuse [40] ; les inoculations sont toujours pratiquées par voie intrapéritonéale dans l'espoir d'obtenir une souche pantrope.

L'âge des lapins varie au cours des passages : au début et jusqu'au vingt-cinquième, le virus aphteux n'est capable de susciter régulièrement la mort des lapereaux que si ceux-ci ont moins de 7 jours ; à partir de ce moment l'âge des animaux qui succombent à l'infection croît progressivement, de sorte que les lapins sont âgés de 7 à 15 jours entre le vingt-cinquième et le cinquantième passage, de 15 à 35 jours entre le cinquantième et le quatre-vingt-dixième passage, de 35 à 45 jours entre le quatre-vingt-dixième et le centième passage.

L'autopsie du lapin a lieu immédiatement après la mort ; dans quelques rares cas, le sacrifice est effectué lors de l'agonie.

La virulence du virus est appréciée par titrage sur souriceau nouveau-né et sur bovin. Dans tous les cas on pratique des dilutions logarithmiques . 1/10, 1/100, 1/1 000, etc.

Sur souriceaux le titrage nécessite l'inoculation des suspensions virulentes, sous le volume de 1/10 de millilitre, par voie intrapéritonéale, chaque dilution étant inoculée à trois souriceaux au moins, le plus souvent à six. L'action pathogène est appréciée par la mort du souriceau.

Sur bovins, le titrage se fait selon la même méthode, mais les inoculations commandent la technique de Henderson [20] dans le derme de la langue : chaque titrage comporte deux animaux qui reçoivent chacun vingt injections sous le volume de 1/10 de millilitre, soit quatre dilutions de virus réparties en séries linéaire de 5 points. De la sorte l'on note sur les deux animaux 10 points d'observation et l'on retient comme positifs ceux où apparaît, au bout de vingt-quatre à trente-six heures, un aphte caractéristique.

Les résultats quantitatifs notés sur les courbes obtenues sur souriceaux ou sur bovins sont déduits des observations expérimentales selon la méthode de Reed et Muench [21].

B. — Résultats.

Nous exposerons le rôle de l'âge du lapin inoculé, successivement dans l'aspect clinique de la maladie et dans la répartition du virus au sein de l'hôte.

1° *Rôle de l'âge du lapin inoculé dans l'évolution anatomo-clinique.* — Du point de vue clinique, nous avons antérieurement décrit les symptômes chez les lapins nouveau-nés [40, 22]. La symptomatologie n'est pas modifiée chez le nouveau-né après de nombreux passages et se caractérise par la flaccidité des muscles abdominaux qui apparaît douze ou vingt-quatre heures après l'injection du virus aphteux, suivie de la paralysie d'abord des membres postérieurs, puis des membres antérieurs (fig. 1 et 2). La respiration devient dyspnéique et la mort survient vingt-quatre ou quarante-huit heures après l'inoculation.

Chez l'animal âgé de 30 ou 40 jours, l'incubation et l'évolution sont souvent plus longues (trente-six à quarante-huit heures) ; la mort ne survient que quatre ou cinq jours après l'introduction de l'agent virulent chez le lapin, lorsque le virus n'est pas encore

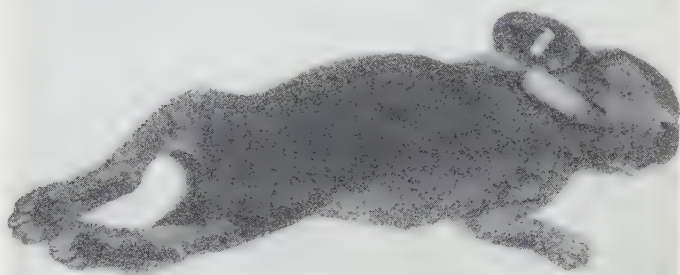


FIG. 1.

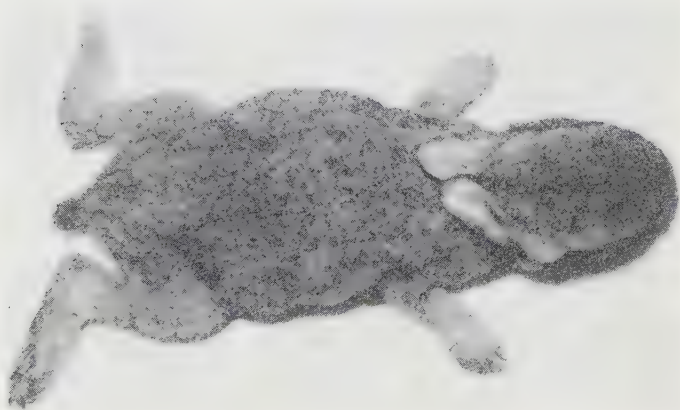


FIG. 2.

« adapté » aux réactions de l'hôte plus âgé. Lorsqu'augmente l'âge des animaux inoculés, les signes paralytiques ne dominent plus le tableau clinique et sont remplacés par une flaccidité de tous les muscles du squelette, débutant par les muscles de l'abdomen et du cou, de sorte que l'aspect de l'animal est assez

caractéristique : il a le ventre pendant et la tête reposant de côté sur les membres antérieurs ; parfois l'encolure est « rouée » (fig. 3, 4, 5).

Du point de vue nécropsique, la maladie aphteuse ne suscite aucune lésion marquée chez le lapin nouveau-né : rappelons cependant que l'on peut noter régulièrement la paralysie de la vessie (ce qui signe vraisemblablement une atteinte du système nerveux moteur de l'organe) et un estomac toujours plein et dilaté. A l'autopsie d'un lapin âgé de 30 ou 40 jours, deux lésions



FIG. 3.

frappent l'observateur : d'une part, des lésions dégénératives importantes des muscles du squelette, caractérisées par des striations blanchâtres avec des localisations électives à l'abdomen, aux cuisses et au cou ; d'autre part, une dégénérescence du muscle cardiaque avec des lésions blanches, irrégulières, nodulaires ou étoilées. Ce tableau nécropsique est d'autant plus accusé que les lapins sont plus âgés et que l'évolution de la maladie s'est poursuivie plus longtemps.

Il n'y a aucune paralysie de la vessie et l'estomac présente un volume normal.

2° Rôle de l'âge du lapin inoculé dans la répartition du virus au sein de l'hôte. — Nous avons montré [23] qu'au cours des

différents passages du virus aphteux chez le lapin, la virulence augmente pour le souriceau nouveau-né et le lapereau nouveau-né, tandis qu'elle diminue progressivement pour le bovin.

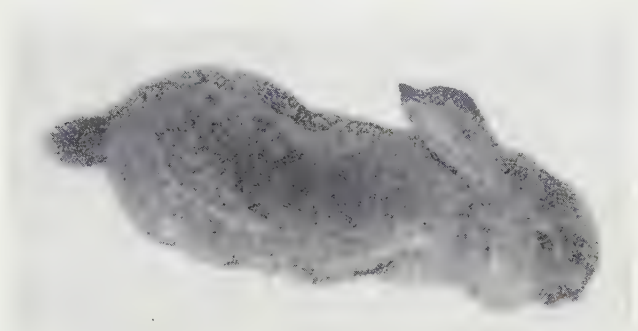


FIG. 4.



FIG. 5.

Ce phénomène est schématisé dans la figure 6 où sont représentés en abscisse le nombre de passages et en ordonnée le titre de la virulence du muscle du lapin. La courbe A représente la virulence à l'égard du souriceau nouveau-né ; la courbe B la virulence vis-à-vis de la vache.

Nous désirions obtenir une souche pantrope, pensant ainsi mettre de notre côté toutes les chances de voir le virus se transformer et devenir, pour la vache, à la fois non pathogène et immunisant à l'égard de la fièvre aphteuse. Pour nous assurer de la répartition du virus aphteux dans tout l'organisme du lapin, nous avons régulièrement titré sur souriceaux les tissus suivants : muscle squelettique, muscle cardiaque, foie et cerveau.

La figure 7 représente les courbes obtenues : rappelons que l'âge moyen des lapins est variable en fonction du nombre des

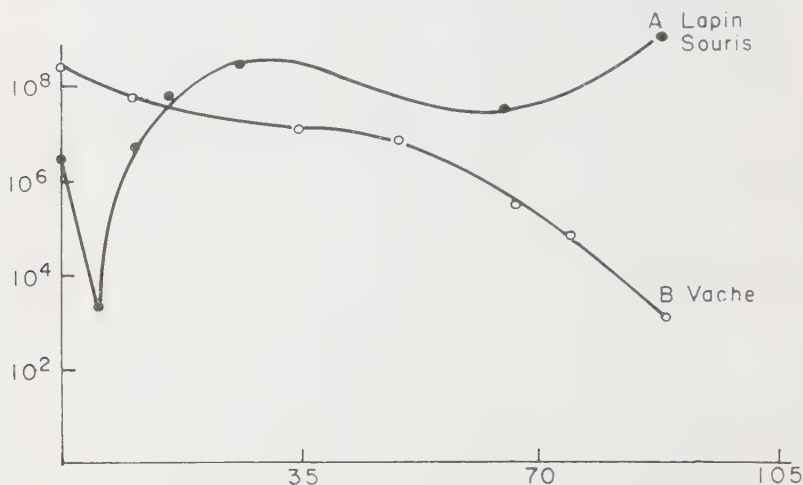


FIG. 6. — En abscisse, nombre de passages réalisés sur lapin. En ordonnée, titre du virus par gramme de tissu. A : DMM souris ; B : DMI vache.

passages effectués, ainsi qu'il est indiqué sur ladite figure. On voit que la richesse en virus aphteux des quatre tissus étudiés suit pour chacun d'eux un tracé sensiblement comparable jusqu'au cinquantième passage.

Entre le cinquantième et le quatre-vingt-septième passage, les courbes se dissocient en deux groupes :

a) Dans le premier, les courbes représentant le titre du virus dans les muscles squelettiques et dans le muscle cardiaque s'abaissent encore un peu, puis s'élèvent ;

b) Dans le second les tracés du taux de virus dans le foie et dans le cerveau s'abaissent rapidement à partir du cinquantième passage.

Cette dissociation pouvait s'expliquer par une mutation ou une sélection progressive de mutants myotropes.

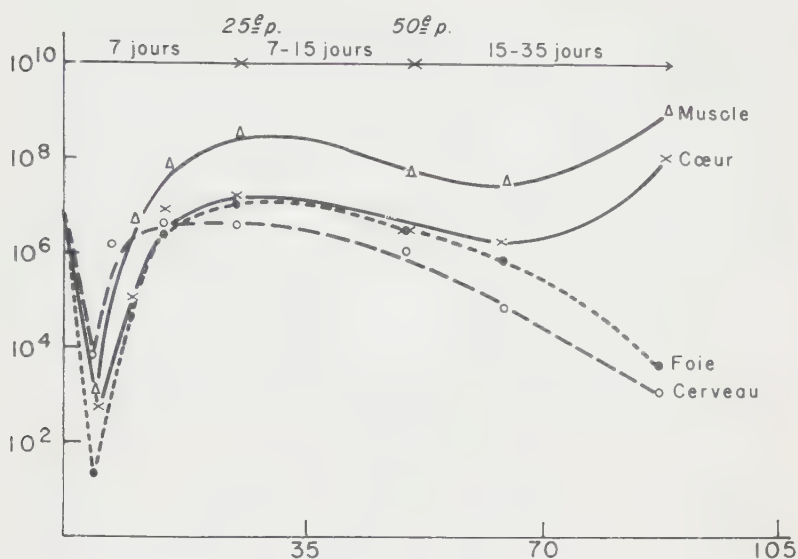


FIG. 7. — En abscisse, nombre de passages sur lapin. En ordonnée, titre du virus par gramme de tissu : DMM souris.

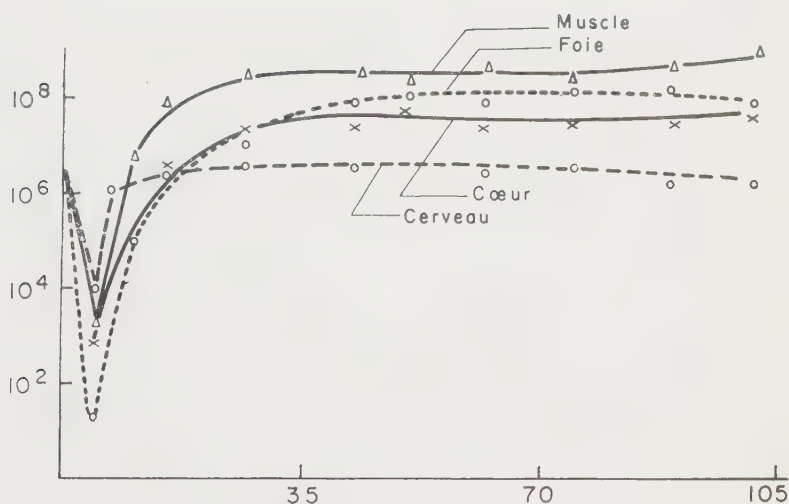


FIG. 8. — En abscisse, nombre de passages sur lapin : inoculé au lapin de 5 jours. En ordonnée, titre du virus par gramme de tissu : DMM souris.

Pour contrôler cette hypothèse nous avons repris du virus aphteux « lapinisé » de différents passages pour l'inoculer chaque fois à un lapin âgé seulement de 5 jours :

Ou bien nous allions obtenir des courbes superposables aux précédentes avec la même dissociation et il s'agissait réellement d'une souche myotrope de virus aphteux ;

Ou bien nous observerions quatre tracés parallèles et la répartition élective du virus dans les muscles du lapin âgé de plus de 15 jours tenait précisément à l'âge de l'animal, ou plus exactement aux modifications qui doivent survenir dans ce tissu après l'âge de 15 jours. En effet, il est peu vraisemblable qu'un seul passage sur animal âgé de 5 jours suffise à réaliser la mutation reverse intégrale d'une souche myotrope à une souche pantrope.

La figure 8 représente l'ensemble des résultats expérimentaux des titrages du virus aphteux dans les différents tissus du lapin. Nous voyons que les quatre courbes obtenues sont sensiblement parallèles comme le laissait prévoir la seconde alternative : *la localisation du virus dans les muscles des lapins âgés de plus de 15 jours n'est pas due à une mutation du virus, mais à une réaction physiologique de l'hôte, qui dépend de l'âge de l'animal inoculé.*

C. — Discussion.

En examinant les courbes de la figure 7, on peut dire que :

a) Durant les 25 premiers passages, les courbes expriment vraiment « l'adaptation » du virus à une espèce normalement peu sensible. Nous entendons par là que les modifications observées dans la multiplication du virus sont provoquées plutôt par des transformations intrinsèques des propriétés biologiques du virus.

b) Entre le vingt-cinquième et le cinquantième passage, les quatre courbes sont sensiblement parallèles, en pente descendante au lieu des tracés horizontaux de la figure 8 : cela traduit peut-être une « adaptation » du virus aux réactions physiologiques de l'hôte, dépendant de l'âge des animaux ; ces réactions n'atteignent qu'après l'âge de 8 jours une intensité suffisante pour inhiber la multiplication du virus aphteux d'origine bovine.

c) Entre le cinquantième et le quatre-vingt-septième passage, la dissociation des courbes de titrage en deux groupes, selon le tissu examiné, met en évidence la grande aptitude du tissu musculaire des lapins âgés de plus de 15 jours à permettre la multiplication du virus aphteux.

Devant l'importance du rôle de l'âge des animaux inoculés dans la répartition du virus chez l'hôte, au point que les titrages réalisés peuvent en imposer pour une mutation du virus, on peut se demander si ce rôle ne s'étend pas aux modifications de virulence. Autrement dit, nous posons la question suivante : la dimi-

nution du pouvoir pathogène du virus aphteux « lapinisé » à l'égard des bovins, est-elle due plutôt à l'âge du lapin qu'au lapin lui-même ? Nous poursuivons à l'heure actuelle des expériences pour tenter de résoudre ce problème et nous effectuons une nouvelle série de passages du virus aphteux souche C Loupoigne sur lapereaux âgés de 4 à 6 jours. Ou bien la pente de la courbe de virulence à l'égard des bovins sera identique à celle de la figure 6, ou bien cette pente sera plus faible. Nous pensons *a priori* qu'un plus grand nombre de passages sera nécessaire pour obtenir la virulence très faible, constatée ici au quatre-vingt-septième passage.

TROISIÈME PARTIE

Conclusions.

Ce que l'on traduit par le terme « d'adaptation » d'un ultravirus, par exemple à une espèce animale habituellement peu sensible à son action pathogène, est en réalité un phénomène complexe comportant au moins deux composantes :

a) L'une, propre au virus, qui est une modification de ses propriétés héréditaires sous la dépendance d'une série de mutations ;

b) L'autre représentée par l'ensemble des réactions non spécifiques de l'organisme-hôte, qui intervient à la fois en « modelant » le phénotype de l'ultravirus et en sélectionnant les mutants aptes à se multiplier en son sein.

Parmi ces réactions non spécifiques de l'organisme, l'âge semble jouer un rôle important : nous pensons, en nous fondant sur un certain nombre d'expériences relatives à la physiologie des mammifères, à la tolérance immunitaire et à la multiplication des ultravirus chez des hôtes habituellement peu sensibles, qu'il existe une véritable crise se situant à l'âge de 8 jours chez les rongeurs. Avant cette crise l'hôte se montrerait particulièrement sensible à l'action pathogène des ultravirus (et ceci est vrai des embryons, singulièrement de l'embryon de poulet). Après le huitième jour, l'animal devient résistant, voire insensible ; cependant si le virus a été préalablement cultivé un certain nombre de fois sur l'animal âgé de moins de 8 jours, il devient capable de se multiplier sur l'hôte âgé de plus de 8 jours et subit de sa part des actions modificatrices beaucoup plus importantes.

De cette manière nous avons réalisé, avec le virus aphteux de type C Loupoigne, 100 passages sur lapins âgés d'abord de moins de 8 jours, puis d'âge progressivement croissant jusqu'à 60 ou 70 jours.

La virulence de ce virus à l'égard du souriceau et du lapereau nouveau-nés diminue au cours des premiers passages jusqu'à un taux de 10^2 ou 10^3 , puis augmente jusqu'à atteindre des titres oscillant entre 10^6 et 10^8 . Elle diminue, au contraire, pour la vache, de $10^{8,5}$ à 10^2 .

L'âge du lapin inoculé intervient à la fois sur le tableau anatomo-clinique observé chez l'animal et sur la répartition du virus au sein de l'organisme-hôte. Ce dernier point a été plus particulièrement étudié en titrant le virus dans quatre tissus différents : muscles du squelette, muscle cardiaque, cerveau et foie. Chez le lapin âgé de moins de 8 jours, le virus se répartit presque uniformément, alors que chez les animaux âgés de plus de 15 jours le virus se multiplie électivement dans le système musculaire. Il n'y a pas sélection de mutants myotropes, car un seul passage de lapin âgé à lapin nouveau-né suffit pour obtenir la répartition du virus caractéristique du nouveau-né.

SUMMARY

THE PHENOMENON OF SPECIFIC ADAPTATION OF VIRUSES IN RELATION TO THE AGE OF THE ANIMALS.

The study of the pathogenic activity of different ultraviruses in new-born mammals has led the authors to the conception that the infected organism, instead of being passively submitted to the virus, transforms and remodels it. In this process, physiological factors depending on the age of the host seem to play the principal role. Foot-and-mouth disease virus type C is liable to be adapted to young rabbits of increasing age (1 to 60 days) and in the course of a hundred passages to undergo certain transformations, particularly of its pathogenicity. Moreover, increasing quantities of virus are to be found in the skeleton muscles. This particular localization is not due to mutation; neither is it related to the number of passages. It depends on physiological modifications in animals more than 8 days old. In rabbits under 8 days, the virus is uniformly present in all organs (heart, skeleton muscles, brain, liver), whereas in more than 15 days old rabbits heart and skeleton muscles contain great quantities of virus (10^{-9}), brain and liver much less (10^{-4} - 10^{-5}).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DALLBORG (G.) et SICKLES (G. M.). *Science*, 1948, **108**, 61.
- [2] SKINNER (H. H.). *Proc. Roy. Soc. Med.*, 1951, **75**, 835.
- [3] DOLL (E. R.), BRYANS (J. T.), MCCOLLUM (V. H.) et CROWE (M. E. W.). *Cornell Vet.*, 1956, **46**, 68.

- [4] REAGAN (R. L.), DELAHA (E. C.), COOK (S. R.) et BRUECKNER (A. L.). *Vet. Med.*, 1955, **50**, 34.
 - [5] SINKOVICS (J.). *Arch. ges. Virusforsch.*, 1957, **7**, 403.
 - [6] GUTIERREZ (J. C.) et GORHAM (J. R.). *Am. J. Vet. Res.*, 1955, **16**, 325.
 - [7] POSPISIL (L.) et BRYCHTOVA (J.). *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1956, **165**, 1.
 - [8] REAGAN (R. L.), YANCEY (F. S.), SING CHEN CHANG et BRUECKNER (A. L.). *Am. J. trop. Med.*, 1956, **5**, 1034.
 - [9] KASCHULA (V. R.), BEAUDETTE (F. R.) et BYRNE (R. J.). *Cornell Vet.*, 1957, **47**, 137.
 - [10] VERGE (J.), PARAF (A.), DHENNIN (L.), DHENNIN (L.) et ASSO (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 3098.
 - [11] GIROUD (P.) et MARINESCO (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **245**, 2566.
 - [12] ROWE (B.), MANSI (W.) et HUDSON (J. R.). *J. comp. Path.*, 1956, **66**, 290.
 - [13] BLANC (G.) et BRUNEAU (J.). *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1956, **140**, 463.
 - [14] CASALS (J.), OLITSKY (P. K.) et ANSLOW (R. G.). *J. exp. Med.*, 1951, **94**, 111.
 - [15] SELZER (G.), SACHS (M.) et VAN DEN ENDE (M.). *S. African med. J.*, 1952, **26**, 201.
 - [16] LAVILLAUREIX (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1955, **149**, 1648.
 - [17] VERGE (J.) et PARAF (A.). *Ann. Nutrit.*, 1957, **11**, 145.
 - [18] VERGE (J.) et PARAF (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1956, **150**, 1905.
 - [19] DUBERT (J.-M.) et PARAF (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 686.
 - [20] HENDERSON (W. M.). *Thèse Université Edimbourg*, 1945.
 - [21] REED (L. J.) et MUENCH (H.). *Am. J. Hyg.*, 1938, **27**, 493.
 - [22] VERGE (J.), PARAF (A.), DHENNIN (L.), DHENNIN (L.) et ASSO (L.). *Off. Intern. Epiz.*, 1958, **49**, 93.
 - [23] PARAF (A.), ASSO (J.) et VERGE (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1958, **246**, 3698.
-

INHIBITION ET ACTIVATION DU TISSU CONJONCTIF PAR LES SÉRUMS ANTI- ET PRO-HYALURONIDASE

par J. LOISELEUR (*)

(avec l'assistance de M^{lles} L. CATINOT et A. CLÉMENTIN).

(Institut Pasteur, Service de Chimie-Physique)

Deux sérums différents se montrent très actifs sur le tissu conjonctif et permettent d'orienter à volonté l'activité de son métabolisme : le sérum antihyaluronidase l'inhibe, tandis que le sérum antiglandulaire, mieux désigné sous le nom de sérum « prohyaluronidase », entraîne son exaltation. Il en résulte de nombreuses possibilités expérimentales, notamment en cancérologie et en radiobiologie.

PREMIÈRE PARTIE

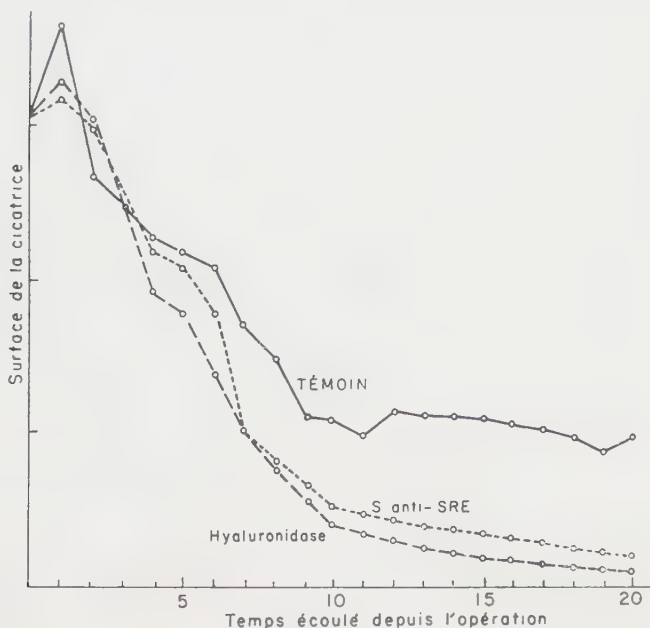
I. — BASES D'UNE SÉROLOGIE DU TISSU CONJONCTIF.

Voici comment on peut concevoir l'intervention de ces sérums. De même que pour tous les tissus, l'activité du tissu conjonctif, c'est-à-dire son métabolisme, dépend des échanges entre ses cellules constitutives et la lymphe interstitielle. Dans le cas particulier du tissu conjonctif, la viscosité du milieu constitue un facteur prépondérant ; elle résulte de la présence des mucopolysaccharides. Cette viscosité, très élevée, ralentit les échanges ; mais elle peut subir une diminution considérable par l'intervention de l'hyaluronidase, enzyme normalement présent dans ce tissu et qui entraîne la dépolymérisation des polysaccharides. L'hyaluronidase constitue ainsi le « pivot » du métabolisme, puisque ce dernier est activé par la diminution de la viscosité. Il en résulte que, pour agir sur le tissu conjonctif, il suffit d'inhiber ou d'exalter l'intervention de sa propre hyaluronidase.

L'attention a été attirée sur l'hyaluronidase au cours de recherches ayant pour objet le mode d'action du sérum antiréticulaire

(*) Manuscrit reçu le 18 septembre 1958.

(sérum de Bogomoletz). Parmi tous les effets attribués à ce sérum, son action sur la réparation cutanée est manifestement constante : une plaie expérimentale, pratiquée sur la souris ou le rat, cicatrise plus rapidement si l'animal est traité avec le sérum antiréticulaire. Pour expliquer cette action, l'idée s'imposait immédiatement de l'attribuer à une activation du métabolisme du tissu conjonctif : hypothèse facilement vérifiable, en injectant dans le derme un



COURBE I. — Cicatrisation d'une plaie expérimentale au cours d'un traitement avec le sérum antiréticulaire ou l'hyaluronidase.

colorant additionné ou non de ce sérum. On constate tout de suite que la présence du sérum entraîne une augmentation de la diffusion. Comme cette diffusion résulte du cheminement du colorant dans un milieu riche en mucopolysaccharides, l'expérience montre une relation entre ce sérum et la dégradation des polysaccharides, c'est-à-dire une intervention de l'hyaluronidase. Effectivement, en répétant l'expérience de cicatrisation avec l'hyaluronidase seule, on constate (courbe I) la similitude des actions entre le sérum antiréticulaire d'une part et l'hyaluronidase d'autre part. Comme cette dernière se montre plus active, le sérum antiréticulaire a été abandonné et toute l'attention s'est portée sur l'hyaluronidase.

TECHNIQUE D'INVESTIGATION. — Pour mettre en évidence l'action d'une substance sur le tissu conjonctif, l'observation de la diffusion intradermique d'un colorant constitue une méthode à la fois rapide, simple et exacte. On mélange à volume égal, une solution à 1 p. 100 de bleu trypan et de la substance à expérimenter en solution dans NaCl à 7 p. 1 000. On injecte 0,1 cm³ de ce mélange dans le derme du rat albinos. Chez l'animal normal et en l'absence de tout agent étranger, le colorant diffuse rapidement pendant les premières heures, en formant une zone colorée circulaire, facilement mesurable. Vers la vingtième heure, le diamètre de la tache se stabilise et reste encore visible pendant plusieurs jours. Cette diffusion dépend de plusieurs facteurs : la viscosité du tissu et l'adsorption progressive du colorant sur les éléments qu'il rencontre au cours de son cheminement. La courbe représentant la vitesse de la diffusion en présence de l'agent expérimenté renseigne immédiatement sur son efficacité et sur le sens de son action.

Dans le cas précédent, l'agent est expérimenté *en action locale*. On peut tout aussi facilement apprécier *l'action générale* qu'il peut exercer sur l'organisme. L'agent est alors injecté seul, en injection sous-cutanée. Après une période prolongée, selon le cas, pendant quelques heures ou quelques jours, le colorant est introduit seul dans le derme.

SUBSTANCES DOUÉES D'UNE ACTIVITÉ LOCALE SUR LE TISSU CONJONCTIF. — Cette technique met en évidence deux groupes d'agents actifs sur le tissu conjonctif :

a) Ceux qui augmentent la diffusion : l'extrait de thyroïde, l'extrait de thymus, l'hyaluronidase.

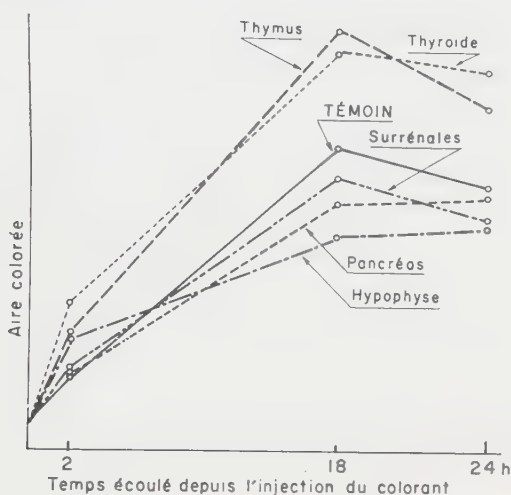
b) Ceux qui diminuent la diffusion : l'extrait de pancréas, l'extrait d'hypophyse, l'extrait de surrénales, la cortisone.

On prélève à trois rats jeunes, d'un poids compris entre 75 et 100 g, la thyroïde, le thymus, le pancréas, l'hypophyse et les surrénales. Ces tissus sont broyés séparément avec 3 cm³ de sérum physiologique. On injecte dans le derme du rat 0,1 cm³ du mélange à volume égal de chaque extrait et de bleu trypan à 1 p. 100. La courbe II reproduit le résultat de l'expérience. Le retard le plus important est constaté avec le pancréas, les surrénales et la cortisone. Pour cette dernière, il convient de rappeler que de nombreux travaux (notamment ceux de Policard et Tuchmann-Duplessis) ont établi son action « freinatrice » sur le développement du tissu conjonctif. Inversement, la surrénalectomie augmente la diffusion (Duran-Reynals).

Pour obtenir maintenant un agent susceptible d'exercer une action générale sur l'ensemble des tissus conjonctifs, il suffit de

préparer les sérums correspondant aux plus actifs des extraits précédents : par voie de conséquence, ces sérums vont exercer des effets opposés à ceux de leurs antigènes respectifs.

D'après les résultats de la courbe II, l'hyaluronidase, plus active que les extraits de thyroïde et de thymus, va servir à préparer un sérum « antihyaluronidase », qui s'opposera à la diffusion. Inversement, l'hypophyse, le pancréas et les surrénales permettent de préparer un sérum « antiglandulaire » qui favorise la



COURBE II. — Action exercée sur la diffusion par différents extraits tissulaires.

diffusion. Ces sérums ainsi préparés sont doués d'une grande efficacité, mais leur préparation est délicate, leur efficacité apparaissant vingt à quarante jours après la dernière injection préparante.

II. — SÉRUM ANTIHYALURONIDASE.

Il convient d'abord de rappeler que Hadidian et Pirie ont préparé en 1948 des dérivés de l'acide hyaluronique capables d'inhiber l'action de l'hyaluronidase. Dans notre procédé, la préparation de l'animal est faite en trois étapes. Les deux premières comportent l'injection de deux hyaluronidases d'origines différentes : animale (extraite du testicule de taureau) et microbienne (extraite du *Staph. aureus*). Ce mélange a pour but d'obtenir un sérum qui soit dépourvu, autant que possible, de la spécificité d'origine, comme c'est le cas pour les sérums préparés par

d'autres techniques (Mac Lean et Hale, Dawson, Meyer et Chaffee). La troisième période de la préparation comporte l'emploi exclusif de l'hyaluronidase d'origine animale.

Les doses indiquées sont relatives à un lapin d'un poids moyen de 2,5 à 3 kg. Dans tous les cas, les hyaluronidases sont mélangées et dissoutes dans 4 cm³ de sérum physiologique. Cette solution est injectée dans la veine.

Il convient de rappeler que 1 unité du produit est supportée par un très faible poids de protéide (environ 1 µg) [tableau I].

TABLEAU I.

I ^e période	Hyaluronidase	
	animale	bactérienne
1 ^e jour	60 unités T.R.*	10 unités R.D.V.*
3 ^e	60	10
5 ^e	90	15
7 ^e	90	20
11 ^e	150	25
14 ^e	150	30
16 ^e	180	35
19 ^e	180	35
<u>2^e période</u>		
après un repos de 15 jours		
1 ^e jour	60	10
3 ^e	90	15
5 ^e	120	20
7 ^e	150	25
9 ^e	180	30
<u>3^e période</u>		
après un repos de 15 jours		
1 ^e jour	15	
3 ^e	15	
6 ^e	30	
8 ^e	45	
11 ^e	45	
13 ^e	150	
16 ^e	240	

(*) 1 unité T. R. équivalent à 2,5 U. R. V. (unité de réduction de viscosité).

A partir du douzième jour suivant la dernière injection, on effectue des prises de sang à intervalles réguliers, pour éprouver l'action du sérum sur la diffusion. En général, le sérum devient actif vers le quarantième jour et ralentit la diffusion.

En même temps, le sérum est actif *in vitro* sur l'hyaluronidase d'origine animale. Il provoque d'abord sa floculation, laquelle est manifeste après un séjour d'une heure à l'étuve (tableau II).

TABLEAU II.

Floculation après addition de		
Hyaluronidase (Taureau)	0,5 cm ³ de serum normal	0,5 cm ³ de serum antihyaluronidase
9 unités	0	+++
3	0	+++
0,9	0	+
0,3	0	opalescence
0,09	0	0

Beaucoup plus intéressante que ce pouvoir floculant, la mesure de la viscosité montre directement l'action inhibitrice du sérum sur l'hyaluronidase.

Puisque l'addition de l'hyaluronidase à l'acide hyaluronique entraîne la dégradation de cet acide, c'est-à-dire la diminution de sa viscosité, l'addition du sérum à un mélange d'hyaluronidase et d'acide hyaluronique doit s'opposer à l'action de l'enzyme, c'est-à-dire que maintenant la viscosité doit rester constante.

Avec une solution d'hyaluronidate de K (provenant du cordon ombilical) :

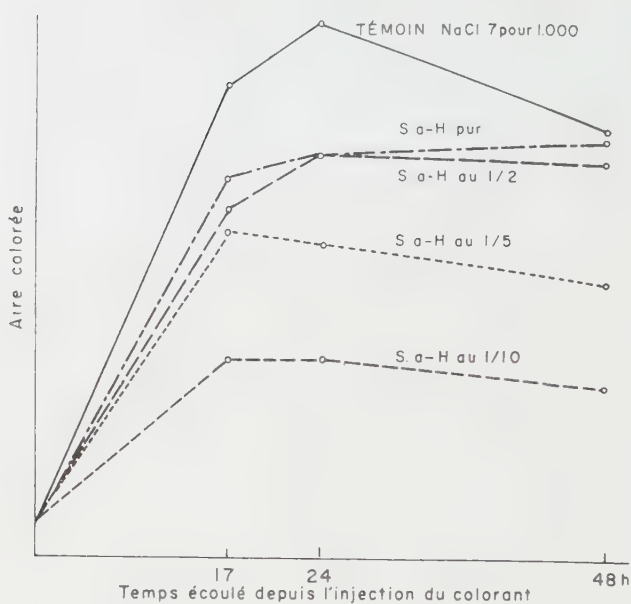
Hyaluronidate de K	50 mg
Tampon à pH = 7	10 cm ³

on prépare les solutions suivantes, en mesurant leur viscosité immédiatement après la préparation du mélange et après un séjour de deux heures à l'étuve à 37° (tableau III).

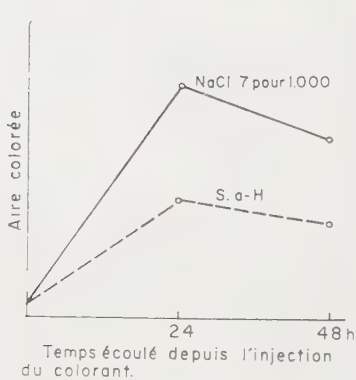
ACTION LOCALE DU SÉRUM ANTIHYALURONIDASE SUR LE RAT. — On constate que le sérum antihyaluronidase (S. aH) diminue la diffu-

TABLEAU III.

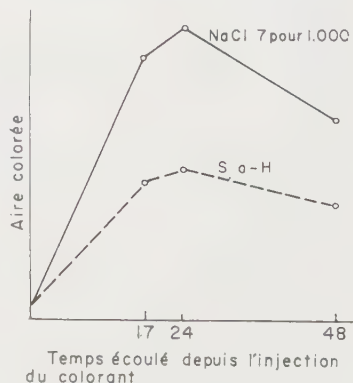
Valeurs de la viscosité			
Immédiatement après la préparation de la solution		Après 2 h à 37°	Variations de la viscosité
Hyaluronidate de K 1cm ³ NaCl à 7 p.1000... 3cm ³	2,54.10 ⁻²	2,58.10 ⁻²	+1,6 %
Hyaluronidate de K 1cm ³ S. antihyal..... 3cm ³	2,79.10 ⁻²	2,83.10 ⁻²	+1,4 %
Hyaluronidate de K 1cm ³ Hyaluronidase..... 1,5u. NaCl à 7 p.1000... 3cm ³	2,60.10 ⁻²	1,18.10 ⁻²	-54,6 %
Hyaluronidate de K 1cm ³ S. antihyal..... 1cm ³ Hyaluronidase..... 1,5u. NaCl à 7 p.1000... 2cm ³	2,58.10 ⁻²	2,64.10 ⁻²	+2,3 %



COURBE III. — Effet de la dilution sur l'action locale exercée par le S. aH sur la diffusion du bleu trypan chez le rat.



COURBE IV.

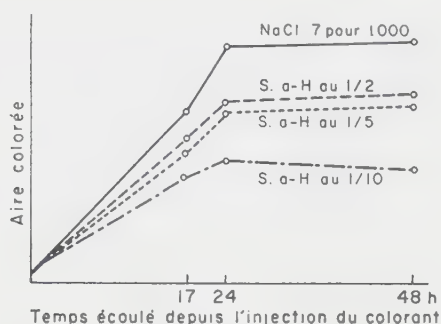


COURBE V

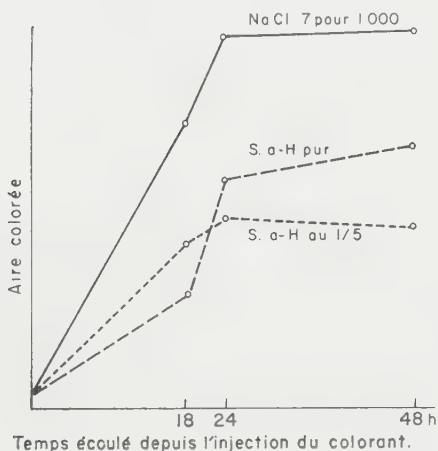
COURBE IV. — Action locale du S. aH sur la diffusion chez la souris.

COURBE V. — Même expérience sur le cobaye.

sion quand il est injecté dans le derme en mélange avec le colorant. De plus, l'expérience montre immédiatement que la dosimétrie du sérum présente une importance considérable. La



COURBE VI A. — Même expérience sur le lapin.



COURBE VI B. — Action locale du sérum antihyaluronidase sur le chien.

courbe III montre que l'effet le plus important est obtenu avec un sérum dilué au 1/10.

Fait intéressant : le sérum aH est dépourvu de spécificité et se montre aussi actif sur la souris (courbe IV), sur le cobaye (courbe V), sur le lapin (courbe VIA) et sur le chien (courbe VIB).

Le volume du mélange de bleu trypan et de sérum qui est injecté dans le derme est égal à 0,025 cm³ pour la souris et à 0,1 cm³ pour les autres mammifères.

ACTION GÉNÉRALE DU S. aH SUR LE RAT. — Il s'agit maintenant d'une épreuve beaucoup plus intéressante, puisqu'elle permet de constater l'action que le sérum aH exerce sur l'ensemble du tissu conjonctif.

Dans une première série d'expériences, le sérum est injecté par voie sous-cutanée (1 cm³). Deux heures après, on injecte dans le derme le colorant pur, dilué seulement avec NaCl à 7 p. 1 000. La courbe VII montre que l'effet est plus marqué quand le sérum est dilué au 1/10.

Cherchons maintenant la durée pendant laquelle le sérum ainsi injecté est capable de manifester son action. Des rats sont répartis en cinq lots : un lot sert de témoin ; les autres lots reçoivent uniformément une injection sous-cutanée de 0,5 cm³ de sérum aH pur. On pratique l'injection intradermique de colorant pur à des intervalles différents : deux heures, un jour, deux jours et trois jours. La courbe VIII montre, dans tous les cas, l'efficacité du sérum.

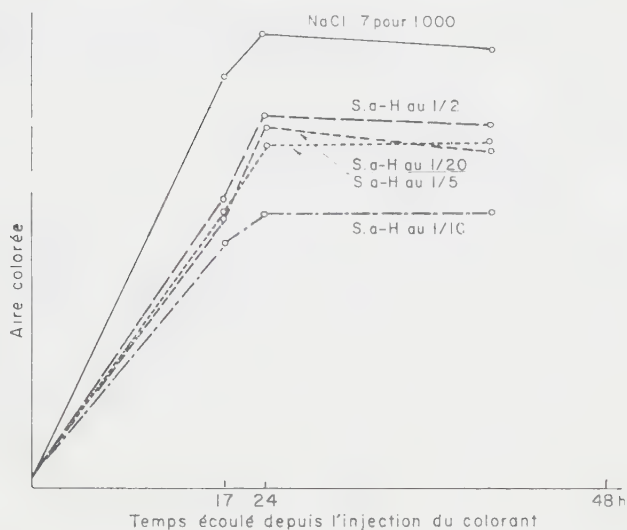
Le même effet se retrouve chez la souris (courbe IX A), chez le cobaye et chez le lapin.

Dose efficace de sérum aH (en action générale).

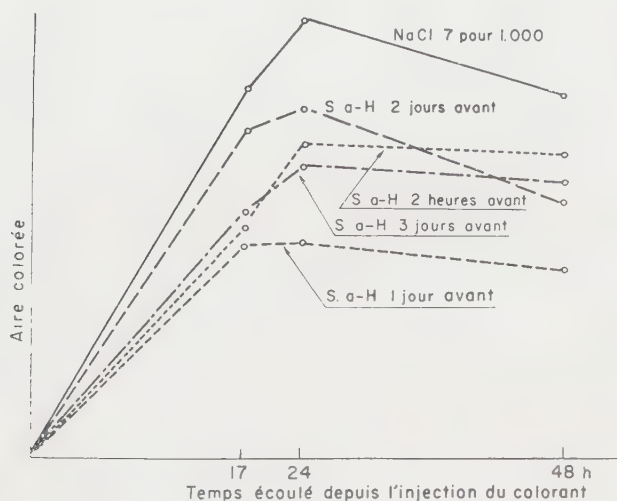
	DOSE DE SÉRUM PUR PAR ANIMAL	DOSE DE SÉRUM PAR KG D'ANIMAL
Souris (25 g)	0,025 cm ³	1 cm ³
Rat (150 g)	0,2 cm ³	1 cm ³
Cobaye (200 g)	0,2 cm ³	1 cm ³
Lapin (2 kg)	0,25 cm ³	0,125 cm ³
Chien (7,5 kg)	1,5 cm ³	0,2 cm ³

PURIFICATION DU SÉRUM ANTIHYALURONIDASE. — Le sérum anti-hyaluronidase peut être purifié par précipitation saline et digestion pepsique. Cette préparation a été assurée par M^{lle} Amoureux, à l'Institut Pasteur de Garches. Ce sérum purifié se montre plus actif que le sérum brut : la courbe IX B montre l'effet exercé sur la diffusion après un délai de vingt-quatre heures entre l'injection sous-cutanée du sérum et l'épreuve intradermique au colorant. La dilution au 1/20 se montre la plus active.

EFFET D'UN TRAITEMENT PROLONGÉ PAR LE SÉRUM ANTIHYALURONIDASE. — Des rats, de poids sensiblement égaux, sont soumis à leur alimentation habituelle et sont pesés tous les jours à la même heure. Un premier groupe sert de témoin et ne subit aucun traitement ; le second groupe reçoit tous les jours une injection intramusculaire de 0,25 cm³ avec la dilution au 1/20 du sérum anti-hyaluronidase purifié. La courbe IX C montre que, loin de



COURBE VII. — Action générale du sérum aH. Le sérum est injecté par voie sous-cutanée. Deux heures après, le colorant pur est injecté dans le derme.



COURBE VIII. — Action générale du sérum aH sur le rat. Le sérum est d'abord injecté par voie sous-cutanée. On pratique l'injection intradermique du colorant pur après des délais croissants.

fatiguer les animaux, le traitement sérique s'est accompagné d'une augmentation de poids plus marquée que chez les témoins (chacune de ces courbes est établie avec la moyenne des poids de chaque groupe d'animaux).

III. — SÉRUM ANTIGLANDULAIRE.

Par un effet inverse, le sérum antiglandulaire (S. aGl) augmente la diffusion. Pour préparer ce sérum, on prélève à un rat jeune l'hypophyse, le pancréas et les surrénales. Ces glandes sont broyées au pilon à travers une passoire métallique à mailles très fines et le broyat obtenu est mis en suspension dans 5 cm³ de NaCl à 7 p. 1 000. Cette suspension est injectée directement dans la veine du lapin, selon le volume indiqué. Il est à noter que de telles injections n'ont jamais entraîné d'accidents. Voici le mode de préparation de l'animal :

VOLUME DE SUSPENSION GLANDULAIRE INJECTÉE DANS LA VEINE DU LAPIN.

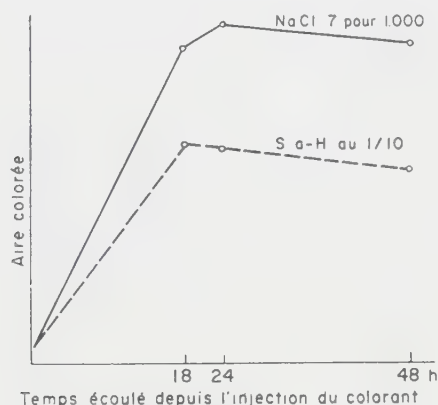
Premier jour	0,25 cm ³
Troisième jour	0,25 cm ³
Cinquième jour	0,5 cm ³
Septième jour	0,5 cm ³
Neuvième jour	0,75 cm ³
Onzième jour	0,75 cm ³
Quatorzième jour	1 cm ³
Seizième jour	1 cm ³
Dix-huitième jour	1,5 cm ³
Vingt-deuxième jour	1,5 cm ³

A partir du vingtième jour suivant la dernière injection, on effectue tous les deux jours des prises de sang pour éprouver l'action locale du sérum sur la diffusion. Le sérum est prélevé quand il entraîne sur la diffusion une augmentation comparable à celle de la courbe X.

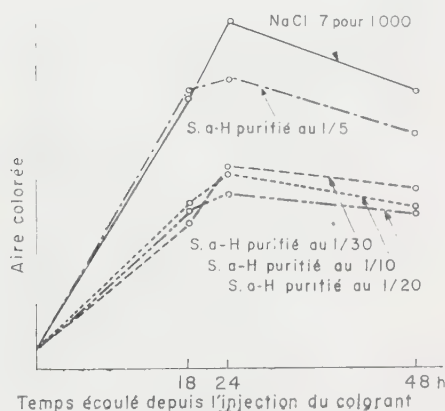
On peut remarquer sur cette courbe X que le sérum est plus actif que l'hyaluronidase. Ce fait peut tenir au mode même de l'action du sérum, qui agit en favorisant l'action de l'enzyme normalement présent dans le tissu conjonctif, et qui se montre plus actif que l'introduction d'une hyaluronidase étrangère, non spécifique.

ACTION GÉNÉRALE DU SÉRUM ANTIGLANDULAIRE. — Le sérum aGl exerce une action générale très marquée : des rats reçoivent l'injection sous-cutanée de dilutions croissantes du sérum. Deux heures après, on pratique l'injection intradermique du colorant pur. La courbe XI A montre l'augmentation considérable de la diffusion après l'injection du sérum dilué au 1/20.

MODE D'ACTION DU SÉRUM ANTIGLANDULAIRE : SÉRUM « PROHYALURONIDASE ». — Une expérience très simple va montrer mainte-



COURBE IX A. — Action générale du sérum aH sur la souris. Injection sous-cutanée de $0,25 \text{ cm}^3$ de sérum dilué au 1/10. Deux heures après, injection intradermique de colorant pur. Il est intéressant de comparer les volumes efficaces de sérum. On constate que ce volume reste sensiblement constant pour les petits animaux, mais qu'il diminue quand l'expérience porte sur le lapin.

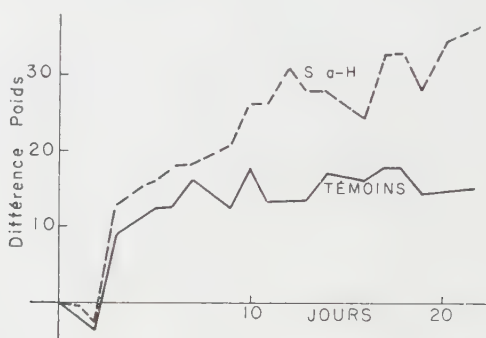


COURBE IX B. — Action générale du sérum aH purifié.

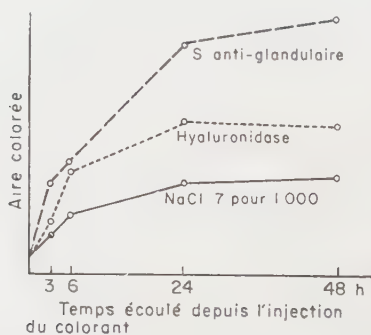
nant que ce sérum antiglandulaire agit en activant l'hyaluronidase présente dans le tissu, en se comportant donc comme un sérum « prohyaluronidase ».

On se rappelle (courbe XI) qu'il existe pour ce sérum une dose optimum au-delà de laquelle l'action sur la diffusion diminue.

Des rats reçoivent dans la peau du dos une injection intradermique de $0,1 \text{ cm}^3$ contenant uniformément la même quantité de bleu trypan associée : a) à un soluté de NaCl à 7 p. 1 000, dans



COURBE IX C. — Effet exercé par un traitement prolongé par le sérum aH.

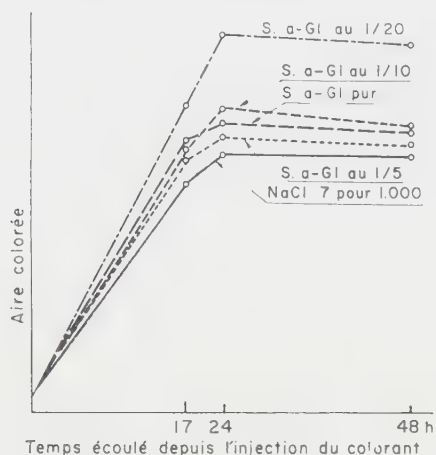


COURBE X. — Action locale exercée sur la diffusion par le sérum antiglandulaire ou par l'hyaluronidase.

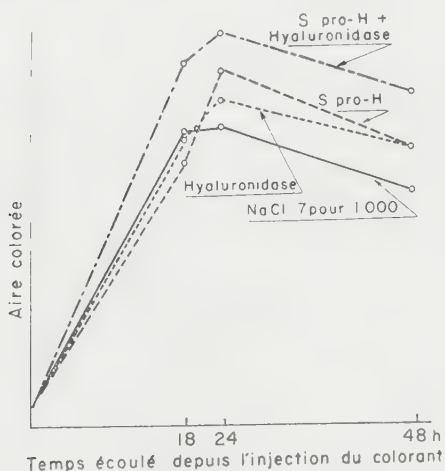
le cas des témoins ; b) à du sérum antiglandulaire ; c) à de l'hyaluronidase ; d) à un mélange d'hyaluronidase et de sérum antiglandulaire. La courbe XI B met en évidence le résultat de l'addition de ces deux facteurs.

Pour interpréter cette synergie de l'hyaluronidase et du sérum antiglandulaire, deux hypothèses sont à envisager : a) ou bien le sérum antiglandulaire contient de l'hyaluronidase, hypothèse réfutée par l'expérience, puisque le mélange de ce sérum anti-

glandulaire et d'acide hyaluronique conserve sa viscosité inchangée après un séjour de deux heures à l'étuve à 37° ; b) ou bien alors,



COURBE XI A. — Action générale du sérum antiglandulaire. Le sérum est d'abord injecté par voie sous-cutanée. Deux heures après, injection intradermique du colorant pur.



COURBE XI B.

le sérum antiglandulaire agit directement sur l'hyaluronidase présente dans le tissu conjonctif, en l'activant ou en favorisant sa libération. Cette dernière hypothèse est la seule façon d'inter-

prêter l'expérience. Il en résulte que le sérum antiglandulaire doit être plus correctement désigné sous l'appellation de *sérum prohyaluronidase*.

SPÉCIFICITÉ DU SÉRUM ANTIGLANDULAIRE. — Contrairement au sérum antihyaluronidase, le sérum antiglandulaire est étroitement spécifique. Cette spécificité est, bien entendu, relative à l'espèce sur laquelle ont été prélevées les glandes utilisées comme antigène.

Si, au cours d'une expérience sur une espèce animale quelconque, l'on ne dispose pas du sérum antiglandulaire correspondant, il reste l'expédient d'utiliser l'hyaluronidase d'origine animale, laquelle se comportera comme le sérum antiglandulaire, quoique avec une activité moindre, comme l'a montré la courbe X.

Les agents actifs sur la diffusion sont ainsi représentés par :

Accélérateurs de la diffusion : Sérum antiglandulaire ou, à défaut, hyaluronidase.

Inhibiteurs de la diffusion : Sérum antihyaluronidase.

DEUXIÈME PARTIE

RÉSULTATS DE LA SÉROTHÉRAPIE SUR LE MÉTABOLISME DU TISSU CONJONCTIF.

Nous disposons ainsi maintenant de deux sérums qui entraînent des effets opposés. La diffusion a été seule considérée jusqu'ici et tout ce qui précède va se résumer en mettant en expérience trois lots de rats. Le premier sert le témoin ; le second reçoit l'injection sous-cutanée de 1 cm³ de sérum antiglandulaire ; le dernier est traité de la même façon avec du sérum antihyaluronidase dilué au 1/10. Deux heures après ces injections, on injecte dans un endroit quelconque de la peau le colorant pur. Après vingt-quatre heures, les surfaces intéressées par la diffusion sont les suivantes :

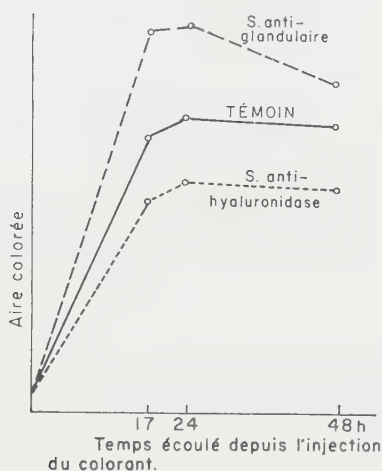
SÉRUM INJECTÉ	AIRE COLORÉE
O (témoin)	1 590 mm ²
S. antiglandulaire	2 620 mm ² (augmentation de 64 %)
S. antihyaluronidase	1 508 mm ² (diminution de 5,1 %)

La courbe XII représente l'ensemble de l'expérience.

L'action de ces sérums sur la diffusion traduit évidemment la conséquence de modifications plus profondes du métabolisme. En voici deux exemples qui intéressent la glycémie et l'hydratation du tissu conjonctif.

1° *Modifications de la glycémie.* — Des rats sont divisés en trois lots : le premier constitue les témoins ; le second reçoit l'injection sous-cutanée de 1 cm³ de sérum antihyaluronidase ; le dernier est traité par 1 cm³ de sérum antiglandulaire. Deux heures après ces injections, les animaux sont asphyxiés par un séjour de trente secondes dans le gaz d'éclairage. On ouvre immédiatement la carotide, en recevant le sang sur fluorure. Les valeurs de la glycémie sont les suivantes.

TÉMOINS p. 100.	SÉRUM ANTIHYALURONIDASE	SÉRUM ANTIGLANDULAIRE
1 g	0,82	1,08
1,02 g	0,84	1,06
1,02 g	0,79	1,08
	0,82	1,04
Moyenne : 1,01	0,81	1,06



COURBE XII. — Diffusion intradermique du bleu trypan chez des rats soumis à un traitement antérieur par les sérums antiglandulaire ou antihyaluronidase.

Pour plus de sûreté, l'expérience a été répétée à quatre reprises ; les variations de la glycémie doivent donc être considérées comme un fait constant. Il en résulte que le sérum antihyaluronidase entraîne une diminution de la glycémie égale à 19,8 p. 100, tandis que le sérum antiglandulaire l'augmente de 4,9 p. 100. L'action des sérums intéresse, par conséquent, tout le métabolisme général. Voici maintenant une expérience qui met en évidence les modifications particulières au tissu conjonctif.

2° *Modifications de l'hydratation du derme.* — Si la substance fondamentale est dépolymérisée (cas du sérum antiglandulaire), l'eau qui était liée aux mucopolysaccharides doit maintenant intéresser l'ensemble des molécules qui résultent de cette dépolymérisation : on doit alors constater une augmentation de l'hydratation des tissus conjonctifs. Inversement, si l'hyaluronidase qui est présente normalement dans les tissus est inhibée avec augmentation de la viscosité et diminution du métabolisme (cas du sérum antihyaluronidase), les polysaccharides ne subissent plus aucune dégradation, ce qui doit s'accompagner d'une hydratation inférieure à celle des témoins. Il est à remarquer que les variations qui pourront être constatées dans cette expérience resteront d'un ordre de grandeur très restreint.

Des rats reçoivent le même traitement que dans l'expérience précédente. Deux heures après les injections, on prélève la peau de la région dorso-lombaire. Ces fragments de peau, pesés avant et après dessiccation totale, présentent les variations suivantes de leur hydratation :

SÉRUM INJECTÉ	EAU DANS 100 g DE TISSU
—	—
O (témoins)	63,7 g
S. antiglandulaire	64,8 g (augmentation de 1,7 %)
S. antihyaluronidase	63,1 g (diminution de 0,9 %)

3° *Action des sérums sur la vitesse de cicatrisation.* — L'observation de la cicatrisation des plaies expérimentales met en évidence les actions générales que les sérums précédents exercent, bien entendu, dans des sens respectivement opposés.

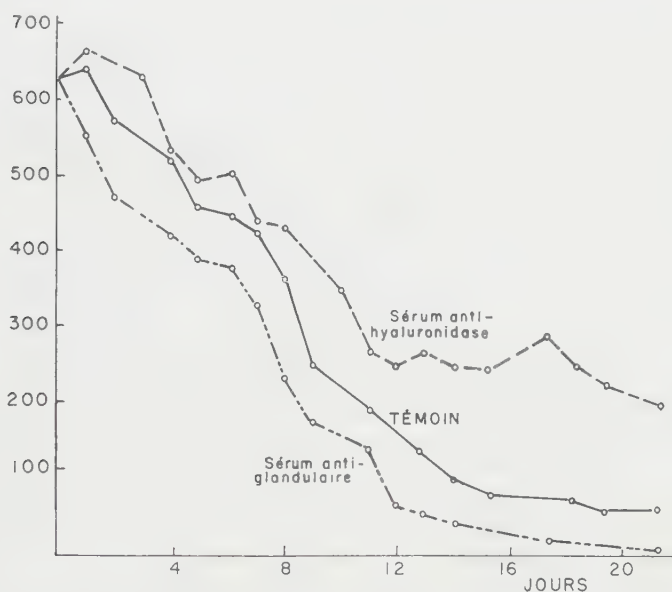
La technique consiste à prélever sur le rat une rondelle de peau, d'un diamètre de 2 cm. Le cercle est tracé avec un emporte-pièce. On prélève cette peau sous anesthésie au rectanol, en dégageant aux ciseaux jusqu'à l'aponévrose. Chez le rat non traité, une première croûte se forme, elle s'épaissit et tombe au cours de la troisième semaine en démasquant un début de cicatrisation limité aux bords de la plaie. Une deuxième croûte, plus petite, apparaît et tombe vers la cinquième semaine. La cicatrisation est alors terminée.

Les dimensions régulières de la plaie permettent de la mesurer chaque jour et d'établir la courbe représentant la vitesse de la cicatrisation. On procède à cette ablation de peau sur trois lots de rats : le premier lot sert de témoin et ne reçoit aucun traitement ; le deuxième est traité tous les jours par une injection sous-cutanée de sérum antiglandulaire ; le dernier lot reçoit du sérum antihyaluronidase. Le résultat de ces traitements sur la vitesse de cicatrisation est remarquable : la cicatrisation est accélérée par le sérum antiglandulaire et ralentie, au contraire, par

le sérum antihyaluronidase, comme il ressort de l'examen de la courbe XIII.

En rapprochant les courbes XII et I, on constate que le sérum antiglandulaire exerce sur la cicatrisation une activation plus marquée que l'hyaluronidase, ce qui cadre bien avec les résultats de la diffusion (courbe X).

4° *Application du sérum antihyaluronidase à l'adénocarcinome de la souris.* — Il était indiqué de rechercher si ces sérums étaient susceptibles de modifier l'évolution d'une tumeur cancéreuse.



COURBE XIII. — Effet du traitement sérothérapique sur la vitesse de cicatrisation : accélération par le S. aGl, ralentissement par le S. aH.

Avec Lacassagne et Rudali, nous avons fait cette expérimentation sur les souris de la lignée RIII, en les traitant soit avec du sérum antihyaluronidase, soit avec de l'hyaluronidase, cette dernière ayant été utilisée parce que nous ne disposions pas alors du sérum antiglandulaire spécifique de la souris.

Dans cette lignée RIII, le cancer de la mamelle apparaît comme une maladie du système mammaire dans son ensemble. A partir de 6 à 7 mois d'âge environ, les femelles présentent un premier adénocarcinome sur l'une des mamelles. Extirpe-t-on cette tumeur dès que son diagnostic est établi, il se manifeste rapidement une

nouvelle tumeur identique, ayant pour siège l'une (ou plusieurs) des autres mamelles.

Chez chacune des 60 souris ayant servi à l'expérience, une première tumeur cancéreuse s'était manifestée vers le septième mois en moyenne. Dès l'extirpation de cette tumeur, les animaux furent répartis en trois lots : 26 ne subirent aucun traitement et constituèrent les témoins ; 7 reçurent chaque jour, pendant deux semaines, l'injection intramusculaire de 3 unités d'hyaluronidase ; 27 furent traités pendant la même durée avec 0,1 cm³ de sérum antihyaluronidase.

Le tableau donne le résultat de l'expérience :

TRAITEMENT	POURCENTAGE DE L'APPARITION D'UNE NOUVELLE TUMEUR
—	—
O (témoins)	50 p. 100
Hyaluronidase	85,7 p. 100
S. antihyaluronidase	25,9 p. 100

Les actions, d'une part, excitantes de l'hyaluronidase et, d'autre part, inhibitrices du sérum antihyaluronidase sont nettement mises en évidence. Ces résultats ne peuvent être interprétés par la considération des facteurs de diffusion, car une telle hypothèse serait en contradiction avec d'autres faits expérimentaux. Plus simplement, on peut admettre que l'hyaluronidase relâche la barrière opposée par l'espèce de capsule conjonctive qui empêche la multiplication des cellules en voie de transformation maligne et permet ainsi l'accélération de la croissance tumorale. Inversement, en neutralisant l'hyaluronidase présente dans le tissu conjonctif ambiant, le sérum antihyaluronidase renforcerait la barrière conjonctive (1).

5° *Application du sérum antiglandulaire en radiobiologie.* — Il est intéressant de voir comment la sérothérapie peut intervenir dans la radiobiologie. Comme on le sait, les différents tissus possèdent des susceptibilités particulières quand on les expose aux rayons X. De plus, pour un même tissu, le degré de sa radiosensibilité varie selon l'état où se trouve la cellule au moment même de l'irradiation : ce facteur très important est précisément ce qui va permettre l'intervention de la sérothérapie.

D'autre part, dans la période qui suit l'irradiation, on assiste simultanément à la manifestation des radiolésions et à la réparation tissulaire, cette dernière étant également susceptible de répondre à un traitement sérothérapique. Il s'agit donc de bien

(1) Le détail de ces expériences est publié dans le *Bull. Ass. Fr. Etude Cancer*, 1958 (en cours de parution).

distinguer le traitement *préventif*, qui précède l'irradiation, et le traitement *curatif*, pratiqué après l'irradiation. On peut prévoir dès maintenant que le traitement sérothérapique pourra agir dans deux directions opposées, soit qu'il augmente la radiosensibilité, soit qu'il active la réparation des radiolésions.

TRAITEMENT PRÉVENTIF. — Il est utile de rappeler les facteurs qui interviennent dans la radiosensibilité d'une cellule. On peut distinguer, par ordre d'importance :

1° L'état de quiescence ou d'activité de la division cellulaire. C'est le facteur prépondérant, qui a été mis en évidence dès les débuts de la radiobiologie.

2° La présence de l'oxygène libre dans la cellule et sa concentration. Cet oxygène va être activé par le rayonnement et oxyder immédiatement toute molécule qui se trouve dans son rayon d'action (5 Å). S'il s'agit d'une molécule banale, l'irradiation n'entraîne pas de manifestations apparentes ; au contraire, s'il s'agit d'un constituant essentiel de la cellule, tel qu'un gène ou le centrosome, la cellule subit une radiolésion.

3° La concentration des métabolites dans la cellule, le glucose par exemple. L'augmentation de la concentration de ces métabolites élève en même temps le nombre des accepteurs « indifférents » pour l'oxygène radioactivé, ce qui constitue pour ce dernier autant de « voies de garage », au bénéfice des constituants essentiels de la cellule, qui se trouve ainsi protégée. Cet effet protecteur (ou effet Dale) est par conséquent lié à l'activité du métabolisme.

En réalité, il est très difficile de considérer isolément chacun de ces trois facteurs. Par exemple, si le métabolisme est très actif, la concentration des métabolites protecteurs va augmenter, mais simultanément aussi la concentration de l'oxygène et, surtout, le rythme des divisions cellulaires : il est impossible de prévoir le facteur qui exercera un effet prépondérant.

Il faudrait évidemment que les conditions expérimentales soient capables d'intéresser séparément soit le métabolisme (mais sans modifier le rythme des divisions), soit le rythme des divisions (sans modifier le métabolisme). Voici une expérience qui fixera les idées.

La peau des petits mammifères constitue un objet favorable pour l'étude de la radiosensibilité. L'administration d'une dose de 2 500 à 3 500 r sur la peau du rat entraîne la chute du poil vers le dixième ou quinzième jour suivant l'irradiation ; après cinq à six semaines, la repousse est totale, sans autre incident. Mais si la dose atteint 4 500 r, la chute du poil apparaît plus précocement, vers le huitième jour, et s'accompagne d'une radiodermite.

Il en sera de même pour la dose de 3 500 r, si la radiosensibilité a été augmentée par un artifice quelconque.

Des rats, d'un poids moyen de 150 g, sont divisés en trois lots qui sont soumis pendant quatre jours à des régimes alimentaires différents. Le premier lot reçoit son alimentation normale, sans aucune modification ; le second lot est suralimenté ; quant au dernier lot, de l'eau seulement lui est offerte, à l'exclusion de toute nourriture.

Après quatre jours, le poids des animaux a varié de la façon suivante :

Rats alimentés normalement	Augmentation de 0,7 p. 100
Rats suralimentés	Augmentation de 6,7 p. 100
Rats sous-alimentés	Diminution de 18,3 p. 100

On administre à ce moment une dose de rayonnement égale à 3 600 r (rayons mous, absorbés dans la couche superficielle du derme, provenant d'un appareil de contact-thérapie) sur un cercle de 25 mm de diamètre prélevé dans la région dorsale.

On pourrait s'attendre à ce que les animaux pléthoriques soient également ceux qui offrent la plus grande résistance à l'effet du rayonnement : tout au contraire, le onzième jour suivant l'irradiation, rien n'est encore décelable chez les animaux sous-alimentés, tandis que les animaux suralimentés présentent des radioépidermites. À la même date, les témoins présentent un début d'épilation. Par conséquent, chez les animaux suralimentés qui possédaient simultanément une abondance de métabolites dans leurs cellules et une multiplication cellulaire accrue, c'est cette augmentation de la croissance cellulaire qui a constitué le facteur décisif pour augmenter la radio-sensibilité.

EFFET DU SÉRUM ANTIGLANDULAIRE SUR LA RADIOSENSIBILITÉ CUTANÉE DU RAT. — Des rats ne subissent aucun traitement et constituent les témoins. Un autre groupe reçoit pendant quatre jours l'injection quotidienne de 0,2 cm³ de sérum antiglandulaire. Dès la fin du traitement, on administre à tous ces animaux, sur une zone circulaire (diamètre, 2 cm) de la région dorso-lombaire, une dose de 2 500 r (tube Holweck, 37,5 KV, 15 mA, filtration par 0,05 mm d'Al, distance anticathode/peau, 17 cm), le reste de l'animal étant protégé par une feuille de plomb.

Chez les animaux traités par le sérum, la chute du poil débute dès le dixième jour. Le quatorzième jour, tous les animaux présentent une radionécrose localisée, entraînant l'élimination totale du cercle de peau irradiée et comparable à une ablation par un emporte-pièce.

L'expérience comporte également un groupe d'animaux traités

par l'injection quotidienne de 30 unités d'hyaluronidase pendant la même période. Au quatorzième jour, ces rats présentent seulement un début d'épilation, ce qui établit pour le sérum une efficacité supérieure à celle de l'hyaluronidase. A la même date, rien ne peut encore être observé chez les témoins.

L'intérêt de cette expérience est de montrer la possibilité de modifier la radiosensibilité par l'intervention d'un agent sérothérapique.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Ces expériences montrent qu'il est possible de modifier, par l'emploi des sérums appropriés, le métabolisme du tissu conjonctif. Le sérum antihyaluronidase diminue ce métabolisme et, en même temps, le nombre des localisations secondaires de l'adénocarcinome mammaire de la souris. Le sérum prohyaluronidase, au contraire, exalte le métabolisme et active la réparation des plaies expérimentales. Son action pourrait être à retenir pour le traitement des cicatrisations, les brûlures accidentelles notamment.

SUMMARY

INHIBITION AND ACTIVATION OF CONNECTIVE TISSUE BY ANTI AND PROHYALURONIDASE SERA.

The author's experiments show the possibility of modifying the metabolism of connective tissue by a treatment with appropriate sera. Antihyaluronidase serum decreases the metabolism and at the same time the number of secondary localisations of mammary carcinoma in mice. On the other hand, prohyaluronidase serum activates the metabolism and the cicatrization of experimental wounds. This activity might be useful for the treatment of trauma, especially burns.

BIBLIOGRAPHIE

- DURAN-REYNALS (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1936, **57**, 597.
DURAN-REYNALS (F.). *Semaine des Hôpitaux*, 1952, **28**, 1047.
HOBBY (G. L.), DAWSON (M. H.), MEYER (K.) et CHAFFEE (E.). *J. exp. Med.*, 1941, **73**, 109.
LACASSAGNE (A.), LOISELEUR (J.) et RUDALI (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 1587.
LOISELEUR (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, **91**, 445.
MAC LEAN (D.) et HALE (C. Y.). *Biol. J.*, 1941, **35**, 159.
POLICARD (A.) et TUCHMANN-DUPLESSIS (H.). *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1535.

SUR UN CRITÈRE DU POUVOIR PATHOGÈNE DES BRUCELLES

(DEUXIÈME NOTE)

par H. JACOTOT et A. VALLÉE (*)

(avec la collaboration technique de A. LE PRIOL).

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie Animale)

Des recherches, qui ont fait l'objet d'un exposé antérieur, nous ont permis de constater qu'il existe une relation entre le pouvoir pathogène d'une brucelle et la persistance de la bactériémie qu'elle provoque chez le cobaye, après inoculation sous-cutanée [1]. Cette notion a été confirmée récemment par Cruickshank [2]. Nous avons poursuivi notre étude et présentons ici les résultats complémentaires auxquels nous sommes arrivés (1).

I. Dans une série d'essais nous avons soumis au critère précédemment établi un certain nombre de souches appartenant à divers types : *abortus*, *melitensis*, *suis*, *suis danois*. Chacun de ces essais comportait l'emploi de 15 cobayes de 400 à 500 g et chaque animal recevait, par voie hypodermique en deux points, 2 cm³ d'une suspension microbienne obtenue de culture sur gélose. Dans la suite, quatre fois, à une semaine d'intervalle, on saignait 4 de ces cobayes par ponction cardiaque, et de chaque échantillon de sang on portait 1 cm³ sur gélose en tube de 18 et 1 cm³ en 9 cm³ de bouillon, ces milieux étant, selon les exigences de la souche étudiée, à base ou de macération de viande peptonée ou d'infusion de pomme de terre.

Les résultats de ces essais sont groupés dans le tableau I.

De la lecture de ce tableau et de la comparaison des chiffres obtenus avec ceux de nos premières expériences, nous avons retenu deux indications. En premier lieu, il est évident que d'une

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 2 octobre 1958.

(1) Nous remercions vivement les professeurs Olitzki, Renoux, Stableforth, Thomsen et Zdrodovsky, à l'obligeance desquels nous devons d'avoir pu étudier un grand nombre des souches mentionnées dans ce travail.

TABLEAU I.

	7 j.	14 j.	21 j.	28 j.	Totaux
<u>"Melitensis"</u>					
- Standard international	● 4/4	● 4/4	● 4/4	● 4/4	16/16
<u>"Abortus"</u>					
- Standard international	● 2/4	● 2/4	● 3/4	● 4/4	11/16
- Alfort (atypique)	● 4/4	● 4/4	● 4/4	● 4/4	16/16
- Frey	● 3/4	● 3/4	○ 0/4	● 1/4	9/16
- Laval	● 4/4	● 3/4	● 4/4	● 3/4	14/16
- B 112	○ 0/4	● 4/4	● 3/4	● 1/4	8/16
- D 19	○ 0/4	● 2/4	● 1/4	○ 0/4	3/16
<u>"Suis americain"</u>					
- Standard international	● 4/4	● 4/4	● 4/4	● 3/4	15/16
- Eber 847	● 4/4	● 3/4	● 2/4	● 1/4	10/16
- Eber H ²	● 4/4	● 4/4	● 4/4	● 3/4	15/16
- Lingen	● 3/4	● 3/4	● 1/4	● 1/4	8/16
- Alfort	● 3/4	● 4/4	● 1/4	○ 0/4	9/16
- Eber 5	● 4/4	● 1/4	○ 0/4	○ 0/4	5/16
- 53 H 84	● 4/4	● 3/4	○ 0/4	○ 0/4	7/16
- 53 D 10	● 1/4	○ 0/4	○ 0/4	○ 0/4	1/16
- 52 52	● 1/4	○ 0/4	○ 0/4	○ 0/4	1/16
- 52 56	○ 0/4	○ 0/4	○ 0/4	○ 0/4	0/16
<u>"Suis danois"</u>					
- Lièvre danois 9	● 4/4	● 3/4	● 2/4	● 2/4	11/16
- Eure-et-Loir	● 3/4	● 2/4	● 1/4	○ 0/4	6/16
- Copenhague	● 1/4	● 1/4	○ 0/4	○ 0/4	2/16
- Lièvre danois 2	● 2/4	● 1/4	○ 0/4	○ 0/4	3/16
- Haute-Marne	○ 0	○ 0	○ 0	○ 0	0/16

Les prises de sang ont été effectuées sept, quatorze, vingt et un et vingt-huit jours après l'inoculation. ● : la brucelle a été retrouvée par hémoculture. ○ : la brucelle n'a pas été retrouvée par hémoculture. 4/4 : 4 cobayes sur 4 ont donné une hémoculture positive.

expérience à l'autre, la même souche donne des résultats qui ne concordent pas exactement ; cela n'est pas pour surprendre car les milieux de culture d'une part, et, d'autre part, l'organisme du cobaye offrent aux brucelles des conditions de développement variables. Il apparaît, en outre, que les diverses souches de type *suis*, isolées à partir de sujets naturellement infectés, puis conservées en collection, sont très inégalement agressives pour l'organisme du cobaye. Cela ne surprendra pas davantage ; les brucelles sont parmi les germes dont le pouvoir pathogène s'affaiblit assez facilement lorsqu'on ne prend pas des dispositions particulières pour les conserver.

II. Dans une autre série d'essais nous avons remplacé les milieux à base de macération de viande peptonée par le bouillon et la gélose Albimi, beaucoup plus favorables à la croissance des brucelles. Toutefois, les souches vaccinales désignées B 19, B 112 et 19 Ba ont été mises dans les milieux à l'infusion de pomme de terre qui sont pour elles des milieux de choix, et la souche B 19 streptomycino-dépendante, dans le seul milieu qui permette son développement. Ces divers milieux ont servi à l'obtention des cultures pour inoculation des cobayes et ultérieurement aux hémoto-spléno-cultures.

Dans chacun des essais, 24 cobayes ont été inoculés aux doses habituelles, mais les prises de sang ont été faites six fois, à une semaine d'intervalle, chaque fois sur 4 cobayes ; les hémocultures étaient pratiquées à raison de 1 cm³ de sang sur gélose nutritive en tube de 22 et de 1 cm³ de sang en 25 cm³ de bouillon nutritif en ballon. Le matériel était ensuite étuvé à 37°, ou en aérobiose, ou en présence de CO₂.

Après la dernière prise de sang, tous les cobayes du groupe étaient mis à la diète ; le lendemain, on en sacrifiait 20 après les avoir pesés ; on prélevait les 20 rates et les pesait ; puis on les passait ensemble au microbroyeur et préparait avec la pulpe globale ainsi obtenue des dilutions successives en eau physiologique ; de chaque dilution on étalait 2 cm³ sur gélose nutritive appropriée en boîtes de Roux. Indépendamment de cette évaluation de la teneur moyenne en brucelles de la pulpe splénique globale, un titrage était effectué par ensemencement et dilutions successives en bouillon approprié ; ce titrage a toujours donné une teneur inférieure à celle qu'indiquaient les ensemencements sur boîtes de gélose.

Les résultats de cette série d'essais sont rassemblés dans le tableau II.

Les chiffres obtenus font ressortir des différences marquées entre les souches étudiées, mais alors que certaines d'entre elles se caractérisent nettement à tous égards, d'autres ne se dis-

tinguent que par rapport à tel ou tel des critères choisis. C'est ainsi que pour *melitensis internationale*, *abortus suis* et *suis internationale*, la bactériémie est intense et durable, la splénomégalie importante et la teneur en brucelles de la rate élevée ; et inversement pour les souches vaccinales B 112, 19 Ba et B 19 strept. Au contraire, on observe pour la souche lièvre (*suis danois*) et pour la souche vaccinale B 19 une certaine discordance des caractères, la première donnant une bactériémie de courte durée, mais avec splénomégalie, la deuxième une bactériémie plus durable, mais sans splénomégalie.

TABLEAU II.

Type microbien	Prises de sang après						Totaux	Totaux réduits	Pulpe splénique globale	
	7 j.	14 j.	21 j.	28 j.	35 j.	42 j.			Poids	Teneur en microbes
<u>Melitensis</u>										
- Standard international	● 4/4	● 4/4	● 4/4	● 4/4	● 3/3	■ 4/4	23/23	15/15	0.383	10 ⁷
<u>Abortus</u>										
- JUL	● 4/4	● 4/4	● 4/4	● 4/4	● 3/4	● 3/4	22/24	14/16	0.569	10 ⁵
- B 19	● 4/4	● 4/4	● 1/4	● 1/4	● 1/4	○ 0/4	11/24	3/16	0.164	10 ²
- B 112	● 3/4	● 3/3	○ 0/4	○ 0/4	○ 0/4	○ 0/4	6/24	0/16	0.151	moins de 5 au cm ³
- 19 Ba	○ 0/4	○ 0/4	○ 0/4	○ 0/4	○ 0/4	○ 0/4	0/24	0/16	0.156	- id -
- B 19 Strept.	○ 0/4	○ 0/4	○ 0/4	○ 0/4	○ 0/4	○ 0/4	0/24	0/16	0.163	- id -
<u>Suis américain</u>										
- Standard international	● 4/4	● 4/4	● 4/4	● 4/4	● 3/4	● 3/4	22/24	14/16	0.539	4 x 10 ⁶
<u>Suis danois</u>										
- Lièvre danois 5	● 4/4	● 1/4	○ 0/4	○ 0/4	○ 0/4	○ 0/4	5/24	0/16	0.246	10 ²

Les prises de sang ont été effectuées pendant six semaines, après quoi on a évalué la splénomégalie moyenne et la teneur moyenne en brucelles de la pulpe splénique.

En ce qui concerne la souche B 19 une remarque s'impose : si, contrairement à ce que nous avons toujours observé, cette brucelle a provoqué une bactériémie durable, constatée encore cinq semaines après l'inoculation, seul 1 tube sur 8 a donné une culture microbienne aux prélèvements effectués après trois, quatre et cinq semaines ; et la teneur du sang en brucelles était alors très faible, de l'ordre de 1 unité par centimètre cube ; il s'agissait donc d'une bactériémie mineure.

Ce comportement inusité de la souche B 19 s'explique à la lumière de certaines constatations faites dans la pratique des vaccinations ; il arrive que cette brucelle manifeste, dans l'organisme de la vache, un pouvoir de diffusion indésirable, et il arrive aussi que l'homme, contaminé accidentellement par elle, présente quelques troubles ; dans l'un et l'autre cas c'est probablement la réceptivité individuelle du sujet qui est en cause plutôt que des variations de virulence du microbe ; il n'en demeure pas moins, les expériences rapportées ici l'ont montré, que l'atténuation de la souche B 19 est moins accusée que celle des souches 19 Ba et B 19 strept. qui dérivent d'elle.

RÉSUMÉ.

Chez le cobaye, l'inoculation sous-cutanée de brucelles engendre une bactériémie qui est déjà décelable une heure après et qui se maintient avec une certaine continuité, au moins pendant les premières semaines lorsqu'elle doit durer. La teneur en germes de la suspension inoculée n'a pas une influence déterminante sur l'intensité et la durée de cette bactériémie lorsque les quantités injectées sont de l'ordre de quelques milliards à quelques dizaines de milliards au centimètre cube.

Certaines souches particulièrement stables provoquent régulièrement une bactériémie intense et durable ; d'autres également stables ne sont retrouvées dans le sang que pendant quelques jours et en petit nombre ; parmi les premières se rangent les souches internationales des trois types principaux, et parmi les secondes plusieurs souches vaccinales qui ont été largement employées dans les troupeaux et les collectivités humaines.

Toutefois, d'assez nombreuses souches sauvages, isolées plus ou moins récemment, se rapprochent par les caractères de la bactériémie qu'elles engendrent des souches vaccinales ; elles se sont atténuées ou dans l'organisme animal ou au laboratoire ; et inversement, il arrive qu'une souche vaccinale engendre une bactériémie de quelque durée, en raison, peut-être, d'une plus grande réceptivité des cobayes inoculés ; en pareil cas les hémocultures tardives ne révèlent qu'un très petit nombre de germes.

Les conclusions auxquelles nous étions arrivés antérieurement restent donc valables : le degré d'atténuation du pouvoir pathogène des brucelles peut s'établir par inoculation sous-cutanée au cobaye. Mais, tenant compte de ce qu'il y a des souches vaccinales confirmées qui donnent chez un certain nombre de sujets une bactériémie de quelques semaines, nous proposons une modification au calendrier des prises de sang ; celles-ci seraient faites à partir de la troisième semaine seulement et jusqu'à la sixième

semaine (tableau II, totaux réduits) ; l'intensité et la durée de la bactériémie dans de telles limites donneraient une mesure assez précise de l'atténuation pour permettre de distinguer les souches offrant les garanties désirables d'innocuité pour les espèces naturellement sensibles de celles qui, en raison de leur virulence plus ou moins caractérisée, devraient être tenues pour dangereuses ou douteuses.

SUMMARY

A CRITERION OF THE PATHOGENICITY OF *Brucella*.

The authors confirm their previous paper : the degree of attenuation of *Brucella* can be determined by subcutaneous inoculation into guinea pigs. But it is advisable to carry out hemocultures from the third week until the sixth ; in such conditions, the duration and importance of the bacteriemia are significant.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] JACOTOT (H.) et VALLÉE (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 121.
[2] CRUICKSHANK. *J. Hyg.*, 1957, **55**, 140.
-

PRÉPARATION D'ANATOXINES DIPHTÉRIQUE, TÉTANIQUE ET STAPHYLOCOCCIQUE DE HAUTE PURETÉ, ADSORBÉES SUR PHOSPHATE DE CALCIUM (BRUSHITE)

par M. RAYNAUD, E. H. RELYVELD, A. TURPIN
et R. MANGALO (*).

(Institut Pasteur, Annexe de Garches)

L'emploi d'anatoxines de haute pureté comme vaccin a fait l'objet de nombreuses réserves. Certains auteurs pensent que les impuretés, c'est-à-dire les antigènes bactériens autres que l'anatoxine proprement dite et présents dans les préparations brutes, peuvent jouer un rôle adjuvant dans l'établissement de l'immunité. Ce rôle adjuvant est généralement considéré comme non spécifique. Lahiri [1] admet cependant que les filtrats bruts de culture du bacille diphtérique contiennent un facteur adjuvant naturel, qui est relativement spécifique : il n'a de propriétés adjuvantes que pour l'anatoxine diphtérique et non pour l'anatoxine tétanique.

Largier [2] a trouvé que le pouvoir immunisant d'une anatoxine tétanique pure est légèrement inférieur à celui d'une anatoxine brute, sans indiquer s'il a utilisé ou non dans ses essais un adjuvant non spécifique.

Scheibel [3] a montré, par contre, que pour la diphtérie, les anatoxines purifiées partiellement (2 000 UF/mg N) ont un pouvoir vaccinant supérieur ou égal à celui des anatoxines impures de même valeur flocculante. L'épreuve utilisée par cet auteur était pourtant une épreuve complexe, rappelant l'infection humaine.

Au terme d'une série de recherches sur des méthodes simples de préparation des toxines tétanique, diphtérique et staphylococcique pures, nous avons pensé que l'activité antigénique parfois plus faible, trouvée pour certaines anatoxines purifiées, pouvait être due à des dénaturations partielles provoquées par les moyens employés pour la purification et difficiles à contrôler dans le cas où le matériel de départ utilisé pour la purification est constitué par une anatoxine brute, c'est-à-dire par une toxine brute (filtrat de culture) détoxifiée par le formol *avant* la purification.

(*) Manuscrit reçu le 28 juillet 1958.

La détoxification dans ce cas nécessite en effet des concentrations de formol relativement élevées et un séjour assez prolongé à l'étuve, la majeure partie de la formaldéhyde devant se combiner aux divers autres constituants du filtrat de culture en plus de la toxine. L'anatoxine peut ainsi avoir subi une action « trop forte » du formol, sans qu'il soit possible de contrôler l'opération de façon efficace, étant donné les variations de composition des toxines brutes.

De plus, les seules déterminations que l'on puisse effectuer aux divers stades de purification d'une anatoxine brute sont des déterminations du pouvoir de combinaison (floculation, doses combinées hémolytiques, etc.). Or, le pouvoir de combinaison avec l'anticorps peut persister malgré des altérations assez profondes de la molécule d'anatoxine. Ces altérations se manifestent, dans le cas où elles sont assez prononcées, par un allongement du temps de floculation avec un sérum donné, dans des conditions par ailleurs égales, de concentration totale en azote (toxine + sérum), de température, de pH, etc. (Bowen [4]).

Il ne semble pas que l'on ait attaché jusqu'ici une grande importance à ce signe de dénaturation partielle, probablement parce qu'il n'a qu'une valeur comparative, les valeurs absolues du temps de floculation variant considérablement avec les sérums employés.

Quant à la détermination directe du pouvoir antigénique, elle nécessite des épreuves assez longues, mettant en jeu de nombreux animaux. Elle ne peut donc être faite après chaque stade du processus de purification et, à notre connaissance, elle n'a été effectuée que sur le produit final.

C'est pourquoi nous avons cherché à préparer des anatoxines à partir de toxines de haute pureté. Au cours des différentes manipulations qui permettent d'obtenir ces dernières, on peut contrôler la pureté et vérifier l'absence de dénaturation en mesurant à la fois le pouvoir de combinaison et l'activité toxique.

Nous avons décrit ailleurs les méthodes que nous utilisons pour la préparation des toxines tétanique [5], diphtérique [6] et staphylococcique [7].

Les caractères des toxines obtenues et que nous avons utilisées dans les expériences actuelles sont rapportés dans le tableau I.

La toxine diphtérique et la toxine staphylococcique ayant été purifiées par chromatographie sur phosphate de calcium préparé selon Tiselius [12], nous avons pensé qu'il serait intéressant d'utiliser ce corps comme adjuvant non spécifique lors de l'immunisation, en mettant à profit les observations que nous avons faites sur les facteurs conditionnant l'adsorption et l'élution de ces toxines.

TABLEAU I.

Toxine	UF/mg N	Nombre de constituants *	Activité toxique
Diphtérique	2800-3000	1 (+ 1)	30 DMH/Lf 200.000 DMH/Lf **
Tétanique	2500-3500	1 (+ 2)	20.000 DMH/Lf
Staphylococci- que alpha	1000*** à 1300	2	100 à 300 DMH/Lh

(*) Le nombre de constituants a été déterminé par la méthode de précipitation spécifique en gel d'Oudin [8], Oakley [9]. Les chiffres entre parenthèses correspondent à la présence d'antigènes mineurs, visibles seulement lorsqu'on emploie un très grand excès de toxine. A l'équivalence, ces préparations ne révèlent qu'un seul constituant apparent.

(**) Doses minima réactives déterminées par injection intradermique au lapin [40].

(***) Lh = Doses combinées hémolytiques [41].

Nous avons d'abord détoxifié les toxines pures précédentes par le formol dans les conditions suivantes de pH et de température.

1° TOXINE DIPHTÉRIQUE.

La détoxification a été réalisée à pH = 8,0-8,2 à 37° et avec une quantité de formol de l'ordre de 3,5 µg par unité de floculation.

La toxicité diminue d'abord très rapidement dans une première phase qui dure environ vingt-quatre heures. La toxicité résiduelle disparaît ensuite progressivement, dans une deuxième phase plus lente. La détoxification est complète après environ cinq jours.

A 10 ml de toxine purifiée (2 800 Lf/mg N) à la concentration de 250 Lf/ml en tampon CO_3NaH à 1 p. 1 000, on a ajouté 0,2 ml de la dilution au 1/10 de formol du commerce neutralisé (concentration volume/volume : 2 p. 1 000). Température, 37° (tableau II) :

TABLEAU II. — Détoxification de la toxine diphtérique.

TEMPS	TOXICITÉ (*)
0 heure	—
24 heures	$5 \cdot 10^7$
48 heures	$5 \cdot 10^5$
4 jours	10^2
	$< 10^2$ (**)

(*) Exprimée en doses minima réactives (lapin) par millilitre. (**) 1 ml injecté au cobaye de 250 g n'a provoqué aucun symptôme chez cet animal, en particulier aucune perte de poids.

Il n'est pas nécessaire de réajuster le pH au cours de cette opération, la concentration du tampon étant assez élevée.

Après détoxification complète, le produit est dialysé pendant trois jours contre du tampon $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, 0,07 M.

Cette dialyse assure l'élimination du formol en excès et permet le remplacement du tampon CO_3NaH par un tampon $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, 0,07 M, remplacement qui est motivé par les raisons suivantes : si l'on essaie de filtrer, sur membrane stérilisante ou sur bougie, de l'anatoxine diphtérique (ou de la toxine) dissoute dans un tampon de faible force ionique, l'anatoxine est très fortement adsorbée. Si l'on emploie la solution éluante [6] sur phosphate de calcium ($\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, 0,07 M), l'adsorption est pratiquement nulle et on peut filtrer facilement l'anatoxine. La présence du phosphate permet par ailleurs (Cf. ci-dessous) la formation d'un précipité de phosphate de calcium au sein même de la solution d'anatoxine.

On pourrait évidemment détoxifier la toxine dissoute directement en $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, 0,07 M. Nous avons noté que la détoxification se faisait moins bien en présence de phosphate disodique qu'en présence de bicarbonate. Après redétermination du titre flocculant, on dilue par une solution de tampon $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, 0,07 M, jusqu'à obtenir une concentration de 60 UF/ml. On stérilise par filtration sur membrane stérilisante.

2° TOXINE TÉTANIQUE.

La toxine tétanique est détoxifiée à $\text{pH} = 8,0-8,2$ à 37° par une quantité de formol égale à $1,75 \mu\text{g}$ par unité de flocculation.

L'addition de formol amène une baisse quasi immédiate de la toxicité qui est ramenée, dans le temps nécessaire aux mesures, à 50 ou 30 p. 100 de sa valeur initiale.

La détoxification se poursuit ensuite en deux phases. Dans la première phase, qui dure environ vingt-quatre heures, la toxicité diminue de façon exponentielle en fonction du temps, jusqu'à une valeur très faible, mais non nulle. La toxicité résiduelle disparaît dans une deuxième phase, suivant un processus plus lent. La détoxification est complète en deux à cinq jours.

10 ml d'une solution à 500 Lf/ml en tampon $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, 0,07 M, $\text{pH} = 8,2$, ont été additionnés de 0,1 ml d'une dilution au 1/10 de la solution de formol commercial neutralisée (concentration volume/volume : 1 p. 1 000). Température, 37° (tableau III).

L'absence totale de toxine résiduelle est recherchée par injection de 0,5 ml (500 UF) au cobaye qui ne doit présenter aucun signe de tétanos localisé ni de tétanos « bulbaire » tardif au quinzième jour (d'Antona [14]).

On dialyse contre une solution de $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, 0,07 M pour éliminer l'excès de formol. On redétermine le titre flocculant et

TABLEAU III. — **Toxine tétanique purifiée (2 500 Lf/mg N).**

TEMPS	TOXICITÉ (***)
—	—
0 heure (*)	30.10 ⁶
0 heure (**)	10.10 ⁶
2 heures	10 ⁶
4 heures	10 ⁵
6 heures	10 ³
8 heures	5.10 ²
24 heures	10 ²
4 jours	< 1

(*) Avant addition du formol. (**) Immédiatement après addition du formol.

(***) Nombre de DMM (souris) par millilitre.

on dilue avec une solution de $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, 0,07 M de façon à réaliser une concentration finale de 60 UF/ml. On stérilise par filtration sur membrane stérilisante.

3° TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE.

La détoxification est effectuée à pH = 6,8, à 37°, avec une concentration en formol de 8,75 µg par unité Lh de toxine. Elle est complète en quatre jours (tableau IV).

10 ml d'une solution de toxine staphylococcique purifiée (800 Lh/mg N) à 120 Lh/ml, en tampon phosphate mono-dipotassique, pH = 6,8, concentration = 0,2 M, sont additionnés de 0,3 ml d'une dilution au 1/10 de la solution de formol du commerce (35 p. 100) neutralisée (concentration volume/volume : 3 p. 1 000). Température, 37° (tableau IV).

On ajoute alors 0,30 p. 100 de gélatine (1) et on dialyse pendant

TABLEAU IV.

TEMPS	TOXICITÉ (*)
—	—
0 heure	1,25.10 ⁴
25 heures	10 ³
50 heures	5.10 ²
75 heures	2.10 ²
4 jours	< 10

(*) Nombre de DMH par millilitre.

(1) L'addition de gélatine est ici indispensable pour permettre la filtration sur membrane stérilisante d'amiante ou sur bougie ou sur verre fritté sans dénaturation de l'anatoxine staphylococcique. En l'absence de gélatine, l'anatoxine est souvent dénaturée lors de la filtration. Cette dénaturation se manifeste par une perte, complète ou partielle, du pouvoir de combinaison avec l'antitoxine.

huit heures contre du tampon $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, 0,20 M, pH = 8,0 fréquemment renouvelé, pour éliminer l'excès de formol.

On filtre sur membrane stérilisante. Avec la concentration de phosphate employée, l'adsorption est pratiquement nulle : grâce à la gélatine, la dénaturation est évitée.

On ajoute stérilement la quantité d'eau distillée stérile (environ 2 volumes) nécessaire pour amener la concentration en phosphate à 0,07 M. La concentration d'anatoxine staphylococcique est alors de 40 Lh/ml.

PRÉPARATION DES ANATOXINES ADSORBÉES.

A la solution stérile en tampon $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, 0,07 M (additionnée de 0,1 p. 100 de gélatine dans le cas de l'anatoxine staphylococcique), on ajoute un volume égal très exactement mesuré de solution de CaCl_2 (CaCl_2 , 2 H_2O), 0,07 M préalablement stérilisée, puis une certaine quantité de soude normale stérile, de façon à ajuster le pH à 6,8. La quantité de soude nécessaire est déterminée par un essai préalable (voir plus bas). Elle est de l'ordre de 0,3 ml pour 10 ml de solution de $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, 0,07 M et de 10 ml de solution de CaCl_2 , 0,07 M.

Il est essentiel que le taux résiduel en ions PO_4^{---} libres en contact avec le gel de phosphate de calcium soit inférieur à 0,01 équivalent par litre, pour que l'adsorption des anatoxines soit totale.

Pour obtenir ce résultat, on effectue un essai préalable suivant le modèle ci-dessous.

$\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, 0,07 M, 1 volume ; CaCl_2 , 0,07 M, 0,8 ; 0,9 ; 1,0 ; 1,0 ; 1,05 ; 1,10 ; 1,20 volume ; NaOH, N/1, q. s. p. pH = 6,8.

Centrifuger. Rechercher l'ion PO_4^{---} libre dans le surnageant :

a) Par addition d'un excès de CaCl_2 ;

b) Par titrage du P minéral (2).

On choisit les proportions qui permettent d'obtenir une concentration en PO_4^{---} inférieure à 0,01 M.

On obtient ainsi des anatoxines adsorbées sur phosphate de calcium contenant 30 UF/ml de suspension dans le cas des anatoxines tétanique et diphtérique et 20 Lh/ml dans le cas de l'anatoxine staphylococcique.

La teneur en phosphate de calcium des préparations est de 5 mg environ de phosphate de calcium (poids sec) par millilitre (4,76 mg) et la teneur en NaCl de 4,09 mg/ml.

Il est facile de préparer, si on le désire, des anatoxines adsor-

(2) Nous employons la technique de Sumner [45].

bées à concentrations plus élevées, si l'on veut réduire le volume de l'injection vaccinante ou mélanger des anatoxines diphtérique et tétanique adsorbées, pour avoir des vaccins mixtes.

L'injection sous-cutanée de 0,5 ml à 1 ml de suspension de phosphate de calcium ainsi préparé est indolore. Elle provoque chez l'animal (lapin, souris, cobaye) une réaction inflammatoire discrète, puis un nodule persistant (3).

DISCUSSION.

Comme tous les autres adjuvants non spécifiques, le phosphate de calcium permet de réduire le nombre des injections nécessaires à l'établissement d'une bonne immunité (à deux pour les anatoxines diphtérique et tétanique, à trois pour l'anatoxine staphylococcique, à une pour l'anatoxine botulinique C β [29]).

Le phosphate de calcium a déjà été proposé comme adjuvant non spécifique.

Roux et Yersin [16], en 1889, ayant observé que la toxine diphtérique est adsorbée sur les précipités de phosphate de calcium se formant dans les filtrats de culture, avaient pensé à utiliser cette toxine adsorbée pour les immunisations.

Abt [17], en 1928, a employé l'adsorption sur phosphate de calcium, de même que Ando et Komiyama [18] pour la purification de la toxine et de l'anatoxine diphtériques.

C'est Ramon [19, 20, 21] qui semble avoir utilisé le premier le phosphate de calcium comme adjuvant, en ajoutant à des anatoxines brutes tétaniques du chlorure de calcium en excès. En raison des propriétés irritantes de ces préparations, elles étaient réservées à l'usage vétérinaire. Ramon et Lemétayer [21], comparant l'action chez le cheval des adjuvants suivants : tapioca, alun et chlorure de calcium, ont trouvé que le tapioca constituait l'adjuvant le plus actif.

Wadsworth, Quigley et Sickles [22] ont aussi indiqué le mode de préparation d'une anatoxine diphtérique adsorbée sur phosphate de calcium. Cette technique visait, semble-t-il, surtout à éliminer le formol en excès tout en préparant une anatoxine adsorbée.

Pappenheimer [23] a utilisé le phosphate de calcium comme adjuvant dans l'hyperimmunisation du cheval avec de l'ovalbumine.

Il semble que tous ces essais n'aient pas donné de résultats très concluants et le phosphate de calcium ne figure pas parmi les

(3) L'étude histologique des lésions inflammatoires a été faite par M. Levaditi, que nous remercions bien vivement.

adjuvants préconisés pour la vaccination antidiphtérique dans le rapport sur ce sujet de l'Organisation Mondiale de la Santé [24].

La méthode de préparation que nous proposons diffère sur certains points de celles qui ont été employées dans les essais précédemment rappelés.

1° L'anatoxine utilisée est une anatoxine très purifiée, obtenue par détoxification d'une toxine de haute pureté, non dénaturée.

Nous avons insisté dans notre introduction sur les arguments qui justifient cette technique de détoxification *après* purification.

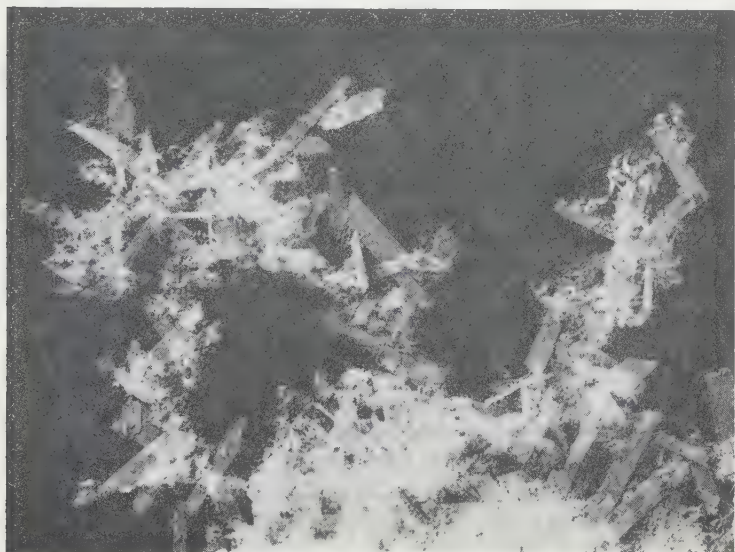


FIG. 1. — Photographie du gel de phosphate de calcium desséché, prise au microscope électronique (cliché Giuntini). Gr. $\times 12\,000$.

2° Le phosphate de calcium utilisé comme adjuvant est obtenu dans des conditions bien définies qui assurent au produit final des propriétés constantes, non variables d'une préparation à l'autre.

L'aspect d'une de ces préparations au microscope électronique est reproduit sur la figure 1 (4).

3° L'adsorption de l'anatoxine est réalisée en tenant compte des remarques générales formulées par Tiselius sur l'adsorption des protéines sur les gels de phosphate de calcium et des études

(4) Nous remercions M. Giuntini qui s'est aimablement chargé de ces examens.

expérimentales que nous avons effectuées sur chacune de ces trois toxines.

L'adsorption est complète sur colonne et en batch-adsorption, pour les faibles forces ioniques (0,01 M) à pH = 6,8.

4° L'adsorption est réalisée par la formation du précipité adsorbant au sein de la solution d'anatoxine.

Dans la terminologie de Levine, Stone et Wyman [26], nos anatoxines sont donc des anatoxines « précipitées » sur phosphate de calcium (5).

Dans le cas de l'anatoxine tétanique et du phosphate d'aluminium, ces auteurs ont trouvé que l'anatoxine « précipitée » (c'est-à-dire adsorbée sur un précipité formé au sein de la solution) avait une valeur antigénique supérieure à celle de l'anatoxine adsorbée sur un précipité (de phosphate d'aluminium) préformé.

5° Le phosphate de calcium présente un certain nombre d'avantages sur les adjuvants les plus employés, l'alun et le phosphate d'aluminium.

Depuis l'introduction de l'alun par Glenney, Pope, Waddington et Wallace [27], de nombreuses variations de détail ont été introduites dans la préparation des anatoxines diphtérique et tétanique adsorbées sur les précipités d'aluminium. Une étude détaillée a été faite récemment par Holt [28] et Van Ramshorst [13] sur ce sujet.

Avec Levine, Stone et Wyman [26], on peut résumer l'ensemble des constatations expérimentales de la façon suivante :

L'action adjuvante dépend de l'adsorption de l'anatoxine à la surface des précipités d'aluminium. L'élution se produisant pour des pH supérieurs à 6,5 et l'injection de solution de pH inférieur à 6,0 étant douloureuse, la zone de pH utilisable pour la réalisation de l'adsorption est très étroite dans le cas des précipités d'aluminium. Elle n'est pas toujours complète à pH 6,5. D'autre part, au pH normal des tissus, on se trouve d'emblée dans la zone d'élution.

(5) Nous estimons que cette terminologie est erronée. Même lorsque le précipité inerte est formé au sein de la solution d'anatoxine, cette dernière n'est pas précipitée (comme elle le serait par addition d'un sel neutre ou d'alcool), mais *adsorbée* sur le précipité inerte. La nature des forces physiques qui la lient au précipité inerte est identique, que le précipité soit préformé ou se forme au sein de la solution.

Ce dernier processus est simplement plus efficace. On observe de même que l'adsorption par passage d'une solution sur un adsorbant disposé en colonne est plus complète que lorsque la solution est simplement mise en contact avec le même adsorbant (« batch-adsorption »).

Nous pensons donc qu'il est préférable de désigner toutes les préparations de ce type sous le nom « d'anatoxines adsorbées ».

Avec les anatoxines adsorbées sur phosphate de calcium, l'élu-tion n'est pas due *in vitro* à la variation du pH, mais à celle de la force ionique. Encore convient-il de noter que la nature des ions joue aussi un rôle et que le chlorure de sodium 0,150 M n'est pas éluant.

La libération de l'anatoxine dans l'organisme est donc proba-blement très lente. Elle peut être due d'ailleurs à des mécanismes beaucoup plus complexes (mobilisation du dépôt par les phago-cytes, etc.) que l'élu-tion réalisable *in vitro* par les changements de force ionique.

Il serait intéressant de connaître la durée de la persistance locale de l'anatoxine adsorbée sur phosphate de calcium au point d'injection ainsi que la vitesse de sa diffusion dans l'organisme. Nous nous proposons de les déterminer par emploi d'anatoxines marquées au ^{14}C , dont nous avons entrepris la préparation.

De plus, à la différence de l'aluminium, le calcium est un cons-tituant normal de l'organisme et l'on n'a pas à craindre un surdo-sage accidentel pouvant entraîner des troubles toxiques éventuels.

Enfin, l'activité antigénique *in vivo* de ce nouveau type d'ana-toxines [anatoxines purifiées adsorbées sur phosphate de cal-cium (6)] est élevée. Son étude fera l'objet de communications ultérieures.

Avec A.-R. Prévot [29], nous avons vu que l'anatoxine botu-lique C β adsorbée sur phosphate de calcium permet de vacciner l'animal (vison) en lui donnant, après une seule injection, une forte immunité.

RÉSUMÉ.

Des anatoxines de haute pureté ont été obtenues par détoxifi-cation directe par le formol, de toxines purifiées.

La toxine diphtérique titrait 2 800 à 3 000 Lf/mg N, la toxine té-tanique, 2 500 à 3 000 Lf/mg N, la toxine staphylococcique, 1 000 à 1 300 Lh/mg N.

Il est important que la détoxification soit effectuée *après* la purification.

Ces anatoxines ont été adsorbées sur un précipité de phosphate de calcium formé au sein de la solution d'anatoxine. Le phosphate de calcium est préparé suivant la technique de Tiselius. L'adsorp-tion des anatoxines est complète dans les conditions précisées : pH = 6,8, force ionique faible, inférieure à 0,01.

Le phosphate de calcium ainsi préparé constitue un bon adju-vant, présentant certains avantages par rapport à l'alun et au phosphate d'aluminium.

(6) Abréviation : A. P. C.

SUMMARY

PREPARATION OF HIGHLY PURIFIED DIPHTHERIA, TETANUS
AND STAPHYLOCOCCAL TOXOIDS ADSORBED ON CALCIUM PHOSPHATE.

Highly purified toxoids have been prepared by the action of formaldehyde on purified toxins.

The titre of diphtheria toxin was 2 800-3 000 Lf/mg N, tetanus toxin : 2 500-3 000 Lf/mg N and staphylococcal toxin : 1 000-1 300 Lh/mg N.

It is important to convert the toxin into toxoid *after* purification.

The toxoids have been adsorbed on calcium phosphate. The adsorbing precipitate is obtained by adding to the toxoid dissolved in sodium phosphate a solution of calcium chloride (according to the method described by Tiselius). Adsorption of the toxoids is complete only in limited conditions : pH = 6,8, low ionic strength (inferior to 0.01).

Calcium phosphate prepared in this way presents certain advantages when compared to other adjuvants, for instance alum and aluminium phosphate.

*
**

Nous adressons tous nos remerciements au professeur Tiselius qui, au cours d'une visite que nous lui avons rendue à Upsala, nous a donné de nombreux renseignements inédits à cette époque sur la technique de chromatographie des protéines sur phosphate de calcium.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LAHIRI (D. C.). *Indian J. med. Res.*, 1951, **39**, 229 ; 1952, **40**, 109 ; et 265.
- [2] LARGIER (H.). *Biochem. Biophys. Acta*, 1956, **21**, 433.
- [3] SCHEIBEL (I.). *Brit. J. exp. Path.*, 1950, **31**, 442.
- [4] BOWEN (H. E.) et WYMAN (L.). *J. Immunol.*, 1953, **70**, 235.
- [5] RAYNAUD (M.) et TURPIN (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 574.
- [6] RAYNAUD (M.) et RELYVELD (E. H.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 424.
- [7] RAYNAUD (M.) et MANGALO (R.). [A paraître.]
- [8] OUDIN (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **75**, 30 et 109.
- [9] OAKLEY (C. L.) et FULTHORPE (A. J.). *J. Path. Bact.*, 1953, **65**, 49.
- [10] JERNE (N. K.). *A study of Avidity*, Copenhagen, 1 vol., 1951.
- [11] TURPIN (A.), RELYVELD (E. H.), PILLET (J.) et RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 185.

- [12] TISELIUS (A.). *Arkiv Kemi*, 1954, **7**, 443 ; *Gazz. Chim. Ital.*, 1954, **84**, 1177. *Angew. Chemie*, 1955, **67**, 245. — TISELIUS (A.), HJERTEN (S.) et LEVIN (O.). *Archiv Biochem. Biophys.*, 1956, **65**, 132.
 - [13] VAN RAMSHORST (J. D.). *The preparation of diphtheria prophylactics*, 1 vol., Utrecht, 1951.
 - [14] D'ANTONA (D.). *Revue Immunol.*, 1951, **15**, 93.
 - [15] SUMNER (J. B.). *Science*, 1944, **100**, 413.
 - [16] ROUX (E.) et YERSIN (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1889, **3**, 284.
 - [17] ABT (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1928, **42**, 1336.
 - [18] ANDO (K.) et KOMIYAMA (T.). *J. Immunol.*, 1935, **29**, 439.
 - [19] RAMON (G.), DESCOMBEY (P.) et LEMÉTAYER (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1931, **46**, 444.
 - [20] RAMON (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1931, **47**, 339.
 - [21] RAMON (G.) et LEMÉTAYER (E.). *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **106**, 73.
 - [22] WADSWORTH (A.) QUIGLEY (J. J.) et SICKLES (G. R.). *J. inf. Dis.*, 1937, **61**, 237.
 - [23] PAPPENHEIMER (A. M. Jr). *J. exp. Med.*, 1940, **71**, 263.
 - [24] Vaccination antidiphthérique et antioquelucheuse. *Rapport n° 61*, 1953, *Organisation Mondiale de la Santé*.
 - [25] KEILIN (D.) et HARTREE (E. F.). *Proc. Roy. Soc., London B.*, 1938, **124**, 397.
 - [26] LEVINE (L.), STONE (J. L.) et WYMAN (L.). *J. Immunol.*, 1955, **75**, 301.
 - [27] GLENNY (A. T.), POPE (C. G.), WADDINGTON (H.) et WALLACE (U.). *J. Path. Bact.*, 1926, **29**, 38.
 - [28] HOLT (L. B.). *Developments in Diphtheria prophylaxis*, 1 vol., Londres, 1950.
 - [29] PRÉVOT (A. R.), RAYNAUD (M.), TURPIN (A.) et SILLIOT (R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1958, **246**, 1632.
-

MULTIPLICATION DU VIRUS RABIQUE DES RUES SUR LA TUMEUR ÉPENDYMAIRE DE LA SOURIS EN CULTURE DE TISSUS. EFFET CYTOLYTIQUE

par P. ATANASIU et P. LÉPINE (*)

(avec la collaboration technique de G. LAURENT, M. COLLOMBIER
et G. BENSE)

(Institut Pasteur, Service des Virus
[D^r P. LÉPINE])

L'étude de la multiplication *in vitro* des virus rabiques, virus des rues et virus fixe, a été dans le passé l'occasion de nombreux essais qui n'ont pas jusqu'ici abouti à une suffisante adaptation du virus à la culture. L'essai de culture *in vitro* sur cellules normales a été réalisé par de nombreux auteurs. C. Levaditi [4] (1914) cultive pendant cinquante jours le virus rabique sur ganglions nerveux, mis en culture sur plasma de singe. Dans le laboratoire de Levaditi, Stoel [2] (1930) attire l'attention sur la nécessité de cultiver le virus rabique dans certaines conditions de choix du tissu et du milieu nutritif; il obtient des résultats satisfaisants sur l'embryon de lapin avec plasma homologue, mais des résultats négatifs sur le cancer murin avec plasma de poule.

Des cultures en série du virus rabique sur cellules normales ont été obtenues par Webster et Clow [3] (1936), puis Kanasawa [4, 5] (1936-1937), Schultz et Williams [6] (1937), Bernkopf et Kugler [7] (1937), Plotz et Reagan [8] (1942), Parker et Hollender [9] (1945), Béquignon et coll. [10] (1954) et Vieuchange et coll. [11] (1956).

Parker et Hollender, étudiant différentes souches de rage fixe passées sur cerveau d'embryon de souris ou de jeunes souriceaux, en présence de sérum de lapin, ont trouvé que le virus se multipliait jusqu'à un titre de 10^{-6} . Au fur et à mesure que l'âge des souris augmente, la multiplication du virus baisse : à 14 jours le titre est de 10^{-1} .

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 octobre 1958.

D'autre part, des essais de culture du virus rabique des rues sur les cellules tumorales (tumeur de Pearce) cultivées sur l'animal (lapin) ont été réalisés par Levaditi et Schoen [12] (1936) avec obtention de corps de Negri dans le cytoplasme des cellules. Pour Koprowski [13] (1956) la croissance du virus fixe sur la tumeur ascitique est faible. Eagle et coll. [14] (1956), employant des cellules KB, constatent que le virus se développe mal et qu'il n'a pas d'action cytolytique. Pearson et coll. [15] (1957) ont montré que sur une tumeur gliale, inoculée par voie sous-cutanée à des souris de souche C₃H, le virus se multiplie jusqu'à des titres de virulence proches de ceux obtenus avec le cerveau de souris, soit 10⁵ ou 10⁶, en donnant des lésions de dégénérescence cellulaire, typiques de rage fixe.

Le problème que nous nous sommes posé dans ce travail était celui de l'essai de la culture du virus rabique des rues sur une cellule gliale d'origine tumorale de la souris maintenue en culture de tissus.

TECHNIQUE.

Le virus (rage des rues) a été isolé d'un cas humain à l'hôpital Pasteur, à Paris, en 1957, par Martin et coll. [16] (1957). Le premier passage en culture fut réalisé à partir du deuxième passage de la souche sur cerveau de lapin. On inocula 0,10 ml d'émulsion cérébrale à la dilution 10⁻² à une culture de vingt-quatre heures de cellules épendymaires. Après trente minutes de contact du virus avec ces cellules à 37° on ajoute le milieu nutritif.

Souche cellulaire. — La souche de cellules épendymaires de souris, maintenue en culture de tissus, nous a été aimablement fournie par Pearson [17] (1955), qui nous a procuré quatre clones. Cette souche, clone O, avait subi plus de 20 passages avant que nous l'utilisions pour nos essais [Atanasiu et coll. [18] (1957)]. Le milieu employé est l'hydrolysate de caséine [Lépine et coll. [19] (1956)], dans la solution de Earle, avec 5 à 10 p. 100 de sérum inactivé de cheval. On change le milieu tous les quatre jours pendant deux mois. La température d'incubation est de 37°.

Titrage du virus. — A partir du quatrième jour de la culture on effectue régulièrement des titrages du liquide surnageant et de ses dilutions, en l'injectant après centrifugation, par voie intracérébrale, à des souris de 14 à 16 g. Le calcul de la DL₅₀ est obtenu d'après la méthode de Reed et Muench [20] (tableau I).

Neutralisation. — Deux sérums immuns ont été utilisés pour les neutralisations : un sérum humain et un sérum de cheval hyper-immun. Le sérum humain avait un titre neutralisant supérieur à 1/125 pour 30 à 60 DL₅₀, le sérum de cheval titrait 1/2 000 pour 200 DL₅₀. Le test de neutralisation est réalisé de la manière suivante : une quantité constante (10 à 50 CTD) de virus rabique de culture est mise en contact avec des dilutions croissantes du sérum antirabique et incubée quatre-vingt-dix minutes à 37°. Ensuite on l'inocule sur les cellules gliales. La lecture de la réaction est faite le quatrième jour.

TABLEAU I. — Multiplication du virus de rage des rues, son titre sur souris ; effet cytolytique entre le 15^e et le 22^e passage.

N° Passage	Titre cerveau souris (log.neg.)	Latence effet cytopath. (jours)	Neutral.		Titre cytopath. (log. neg.)
			Sérum hum.	Sérum chev.	
15	1,5	4		++	
16	2,5	2			
17	2,5	5			
18	3	4			
19	2	5			
20	3	4		1/320	4
21	2	5		++	
22	2,5	4	1/245		3,5

Quand les tubes témoins (sérum normal) sont complètement cytolysés, on calcule l'index de neutralisation (voir tableau I). Les mêmes mélanges (sérum-virus) ont été inoculés à des souris par voie intracérébrale. Le titre neutralisant du sérum est donné par la dilution la plus haute qui empêche la destruction cellulaire en quatre jours.

RÉSULTATS.

Nous avons étudié la multiplication du virus, les passages en série, l'aspect histologique des cellules infectées, la dégénérescence cellulaire et l'identification du virus par les sérums spécifiques.

Nous avons fait 24 passages en série en étudiant chaque fois la morphologie des cellules infectées ; périodiquement, il a été procédé à l'identification du virus au moyen d'un immunsérum, la réaction étant pratiquée à la fois en tube et sur les animaux.

Le premier passage a subi huit changements de milieu pendant une période de trente-neuf jours. A l'examen direct, nous n'avons observé qu'une légère dégénérescence des cellules après dix-huit jours. Le titrage du virus dans la culture (voir fig. 1, graphique I), le quatrième jour, montrait des traces de virus, le dixième jour une absence totale et à partir du quatorzième jour le titre était de 10^2 et évoluait par la suite entre $10^{2,5}$ et $10^{3,5}$. Une partie de la culture, âgée de 27 jours, est fixée au Bouin et colorée par la méthode de Mann, de même qu'une partie des témoins. Cette technique montre une dégénérescence plus marquée des cellules et la présence d'inclusions cytoplasmiques entourées

d'un halo : chez les témoins, il n'y a ni dégénérescence cellulaire, ni inclusions cytoplasmiques, car on peut trouver des inclusions éosinophiles dans les cellules non inoculées provenant de cerveau de cobayes ou de souris normaux [Steinhardt et coll. [21] (1912), Barski et Maurin [22] (1950)], ou dans les cellules HeLa également non inoculées. De plus, le liquide de culture centrifugé et dilué, inoculé aux souris, était virulent à la dilution 10^{-3} .

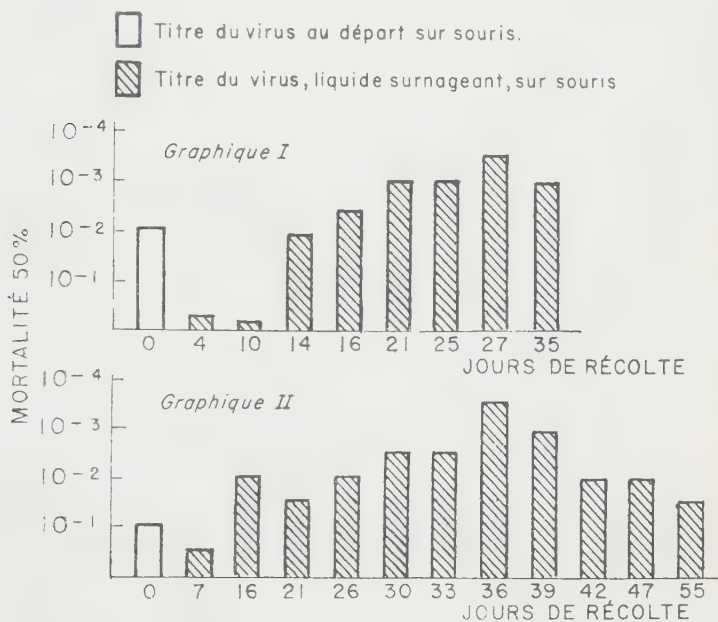


FIG. 1. — Multiplication du virus rabique, en culture de tissus, sur deux passages (titrage sur souris).

Les souris qui succombaient après dix jours présentaient, à l'examen histologique, de nombreux corps de Negri dans le cerveau. Le deuxième passage a été effectué, au bout de dix-huit jours sur les mêmes cellules et dans les mêmes conditions, avec le liquide virulent de la première expérience. La virulence a varié en cinquante-cinq jours de 10^1 à $10^{3.5}$. Le virus du cinquante-cinquième jour (titre 10^3), inoculé à la souris lui a donné une rage des rues typique. La vie de ces cellules s'étale donc sur une période de près de deux mois. Le virus a commencé à être libéré dans le milieu vers le dixième jour ($10^{0.3}$). Au quatorzième jour, il est à 10^2 pour arriver entre 10^3 et 10^4 ,

le maximum, entre le quinzième et le quarantième jour (voir fig. 1, graphique II).

Après ces premiers passages on peut conclure qu'il est possible de cultiver le virus de la rage des rues sur une cellule gliale (ependymome) de la souris. Le virus, après une longue période de latence et d'incubation (dix jours), produit une lente dégénérescence cellulaire et atteint un titre de virulence compris entre 10^1 et 10^4 DL50 se maintenant pendant une période de presque deux mois. Certaines cellules de la culture, en bonne santé apparente, présentent des inclusions spécifiques intracytoplasmiques [corps de Negri] (pl., fig. 1, 2, 3). Trois autres passages ont été réalisés avec des résultats similaires. Les animaux témoins, au cours de cinq passages en série, ont toujours présenté une rage des rues typique.

A partir du cinquième passage les cellules gliales inoculées avec le virus rabique de passage commencent à dégénérer entre le quatrième et le sixième jour, tandis que les témoins demeurent indemnes (pl., fig. 5 et 6, vingtième passage). Les passages se succèdent régulièrement jusqu'au vingt-deuxième, avec titrage régulier sur souris et examen anatomo-pathologique de ces animaux.

Il est à noter que cette dégénérescence totale en quatre à six jours correspond à un titre cytopathogène de 10^3 à 10^4 et à un titre de virulence de 10^2 à 10^3 chez la souris. Ainsi, pour un effet cytolytique obtenu en trois jours en moyenne le même matériel avait chez la souris une période d'incubation de huit à quatorze jours, une virulence dont le titre était entre 10^2 et 10^4 avec examen histologique positif de rage des rues (pl., fig. 4, vingtième passage). L'inoculation du même matériel chez le lapin a également montré une longue période d'incubation et la présence d'une méningo-encéphalite avec de rares corps de Negri.

LÉGENDE DE LA PLANCHE

Cellules gliales 27^e jour. Fixation au Bouin. Coloration hématoxyline-éosine. $\times 640$.

FIG. 1 et 2. — Inoculation virus rage des rues du 2^e passage.

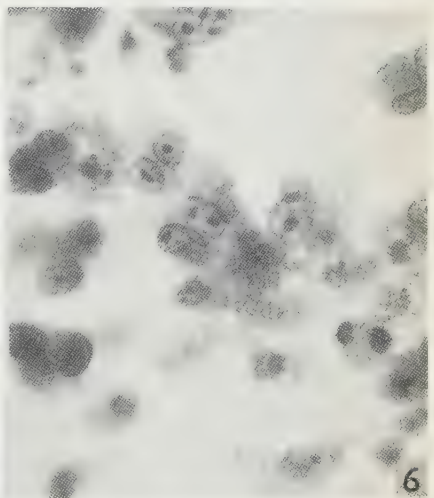
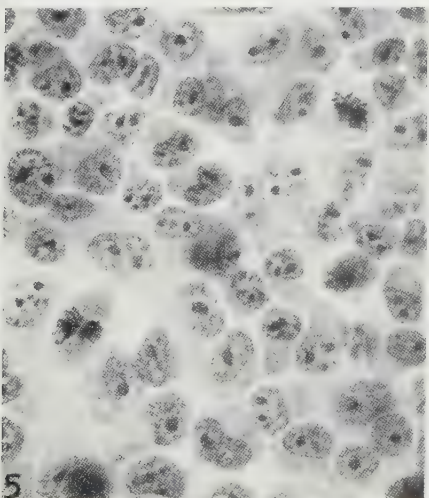
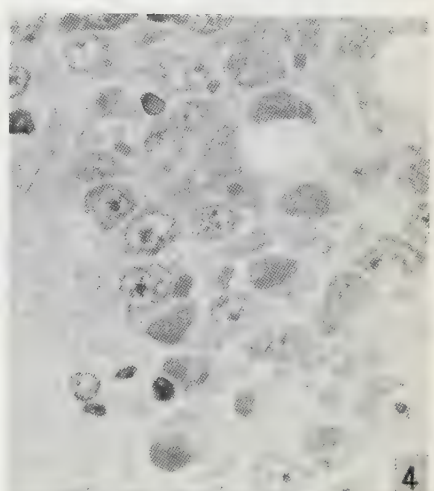
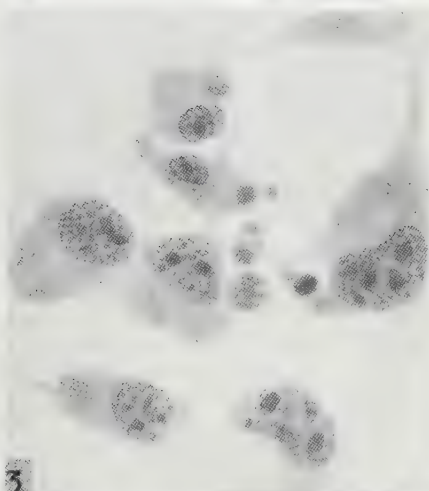
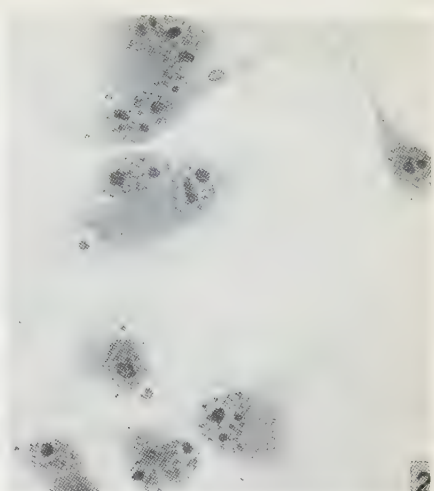
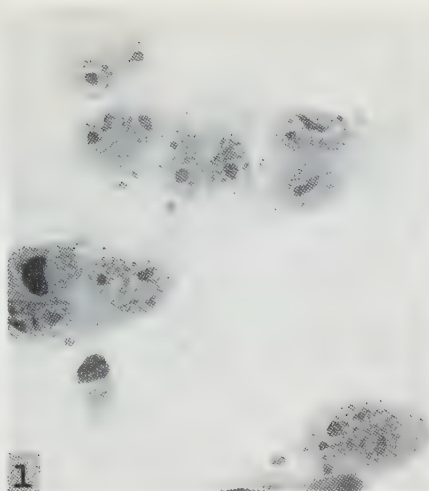
FIG. 3. — Témoin cellules gliales.

FIG. 4. — Cerveau de souris inoculée avec le liquide surnageant du 20^e passage, 10⁻¹. (Corne d'Ammon, présence de corps de Negri. Coloration de Mann. $\times 610$).

Cellules gliales 4^e jour. Fixation au Bouin. Coloration hématoxyline-éosine. $\times 610$.

FIG. 5. — Témoin cellules gliales.

FIG. 6. — Cellules inoculées avec le virus rabique de culture de tissus du 20^e passage, en voie de dégénérescence.



Neutralisation du virus. — Un sérum antirabique de cheval a eu un index de neutralisation 1/320 en présence de 50 CTD50 (virus du vingt-deuxième passage $10^{3.5}$ CTD50).

Un sérum humain antirabique a eu un index de neutralisation 1/245 en présence de 50 CTD50 [virus du vingtième passage titre 10^{-4} CTD50] (V. tableau I).

DISCUSSION ET CONCLUSION.

Après deux passages successifs la virulence du virus rabique dans les liquides surnageants en culture de tissus s'est maintenue constamment entre 10^2 et 10^4 . Des titres de virulence constants entre $10^{1.5}$ et 10^3 ont été obtenus jusqu'au vingt-deuxième passage.

Il est bien certain que la souche de rage des rues se multiplie sur la cellule gliale de souris, d'origine tumorale.

Le virus mis en culture dans les premiers passages avait une période d'incubation de dix à quinze jours et les cellules présentaient régulièrement des inclusions oxyphiles rappelant les corps de Negri. A partir du cinquième passage le liquide virulent surnageant commence à déterminer une dégénérescence cellulaire, qui s'est poursuivie pendant au moins 15 passages. Cette dégénérescence est empêchée par un sérum spécifique (humain ou de cheval). Le vingt-deuxième passage titre régulièrement entre 10^2 et 10^4 et les lésions anatomo-pathologiques chez la souris et le lapin, inoculés avec la culture, sont typiques de la rage des rues. Il est à noter que malgré la cytolyse constante et la durée réduite de la période d'incubation au cours de 17 passages en série, alors qu'on aurait pu penser à une évolution vers le type virus fixe par adaptation du virus à la culture de tissus, la souche a jusqu'ici gardé toutes ses caractéristiques de virus des rues.

Nos expériences montrent, en outre, qu'à l'avenir il sera possible de réaliser un titrage des sérums antirabiques sur culture de tissus en faisant appel à leur aptitude à protéger les cellules contre l'effet cytopathogène. Cette technique présenterait des avantages évidents de gain de temps et d'économie par rapport à la technique classique de neutralisation sur l'animal.

SUMMARY

MULTIPLICATION OF RABIES STREET VIRUS ON MICE EPENDYMO-MA IN TISSUE CULTURE. CYTOLYTIC EFFECT.

After two transfers the titre of rabies virus in the supernatant fluid of tissue culture remained constant at 10^2 - 10^4 .

Twenty-four passages have been carried out. Titres of $10^{1.5}$ -

10³ have been obtained until the 22nd transfer. This proves that rabies street virus grows on mice ependymoma cells in tissue culture. The incubation period ranges from 10 to 14 days. The virus induces the formation of oxyphilic inclusion bodies resembling Negri bodies. From the fifth passage and in the course of 15 transfers, the culture fluid induces a cellular degeneration, which can be prevented by a specific immune serum.

These experiments show that it is possible to carry out the titration of antirabic sera on tissue cultures, a technique which would present many advantages over the usual method of neutralization tests on animals.

The strain used preserved all the properties of a street virus.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LEVADITI (C.). *C. R. Acad. Sci.*, 1914, **159**, 284.
- [2] STOEL (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **104**, 851.
- [3] WEBSTER (L. T.) et CLOW (A.). *Science*, 1936, **84**, 487.
- [4] KANASAWA (K.). *Jap. J. exp. Med.*, 1936, **14**, 519.
- [5] KANASAWA (K.). *Jap. J. exp. Med.*, 1937, **15**, 17.
- [6] SCHULTZ (E. W.) et WILLIAMS (G. F.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1937, **37**, 372.
- [7] BERNKOPF et KUGLER (J.). *Brit. J. exp. Med.*, 1937, **18**, 481.
- [8] PLOTZ (H.) et REAGAN (R.). *Science*, 1942, **95**, 102.
- [9] PARKER (R. C.) et HOLLENDER (A. J.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1945, **60**, 94.
- [10] BÉQUIGNON (R.), GRUEST (J.), VIALAT (C.) et VIEUCHANGE (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **239**, 1162.
- [11] VIEUCHANGE (J.), VIALAT (C.), GRUEST (J.) et BÉQUIGNON (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 361.
- [12] LEVADITI (C.) et SCHOEN. *C. R. Acad. Sci.*, 1936, **202**, 702.
- [13] KOPROWSKI (H.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1956, **63**, 895.
- [14] EAGLE (H.), HABEL (K.), ROWE (W. P.) et HUEBNER (R. J.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1956, **91**, 361.
- [15] PEARSON (H. E.), ATANASIU (P.) et LÉPINE (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 1.
- [16] MARTIN (R.) et ATANASIU (P.). *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1957, **141**, 694.
- [17] PEARSON (H. E.) et LANGERBORG (D. L.). *J. Immunol.*, 1955, **75**, 134.
- [18] ANATASIU (P.) et LAURENT (C.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **245**, 2562.
- [19] LÉPINE (P.), SLIZEWICZ (P.), DANIEL (P.) et PACCAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 654.
- [20] REED (J.) et MUENCH (H.). *Am. J. Hyg.*, 1938, **27**, 493.
- [21] STEINHARDT, POOR et CAMBERT. *J. inf. Dis.*, 1912, **11**, 459.
- [22] BARSKI (G.) et MAURIN (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **78**, 411.

**RÔLE DES BACILLES TUBERCULEUX
TUÉS DANS LA PATHOGENIE DE L'ENCÉPHALOMYÉLITE
DITE « ALLERGIQUE », PROVOQUÉE
PAR DE L'EXTRAIT CÉRÉBRAL
ADDITIONNÉ AVEC DES ADJUVANTS DE FREUND**

par N. CONSTANTINESCO, Th. HORNET, N. BIRZU, O. ZAVATE,
I. PENCEA et S. RUSAN (*).

*(Académie R. P. R., Filiale de Jassy
et Institut de Neurologie I.-P.-Pavlov, Bucarest ;
Institut D^r-I.-Cantacuzène, Filiale de Jassy)*

On considère aujourd'hui comme étant de nature allergique les complications encéphalitiques consécutives à certaines maladies virales humaines, ainsi que les accidents neuroparalytiques survenus à la suite de vaccinations antirabiques. Il interviendrait, dans les premières, une sensibilisation du malade à son propre tissu nerveux, modifié sous l'action du virus en cause. La substance cérébrale, ainsi « dénaturée », deviendrait étrangère pour l'organisme lui-même. La littérature spécialisée, telle qu'elle est résumée dans les travaux du XXX^e Congrès Français de Médecine d'Alger, de 1955 [18], et surtout les rapports qui furent présentés par Lemaire et Debray [8] et par Voisin [47], est riche en observations sur le rôle des « auto-antigènes », des « auto-anticorps » et de l'« auto-allergie » dans la pathologie humaine.

Quant aux syndromes nerveux provoqués par la vaccination antirabique, Remlinger [42] avait depuis longtemps incriminé la substance nerveuse contenue dans le vaccin, mais ce sont Rivers et Schwentker [44, 46] qui ont réussi à reproduire chez le singe une encéphalomyélite démyélinisante, semblable à celle vue chez l'homme, à l'aide d'extraits de cerveau de lapin, dénaturé dans ses composants par la conservation, pendant cinq à trente jours, à la température du laboratoire. Mais, même dans ces conditions expérimentales, les symptômes n'apparaissaient que d'une façon tout à fait inconstante et assez tardivement, soit trois à treize mois après le début du traitement. Ajoutons que l'association des électro-chocs dans le but d'augmenter l'activité encéphalitogène

(*) Manuscrit reçu le 2 juillet 1958.

des extraits cérébraux homologues ou hétérologues est restée sans effets remarquables. Chez les lapins ainsi traités, Kreindler, Olteanu et Chivu [7] n'ont enregistré que de légers processus inflammatoires et une démyélinisation à la limite entre l'état normal et pathologique.

En adoptant les substances « adjuvantes » de Freund et Mc Dermott (huile de paraffine et bacilles tuberculeux tués), reconnues capables d'activer la formation d'anticorps, Morgan et Kabat, Wolf et Bezer [6] ont largement ouvert la voie dans l'interprétation du syndrome humain : par l'administration de tissu cérébral enrobé dans les adjuvants de Freund, on a réussi à provoquer — cette fois-ci dans des proportions élevées et après une courte incubation de quelques semaines — l'encéphalomyélite caractéristique. Ces recherches, en suscitant de nombreux travaux (et nous n'en citerons que celui de Halpern, Bertrand et Lhermitte [5]), ont facilité l'expérimentation sur diverses espèces animales et ont permis l'étude morphopathologique du syndrome, la dissociation des fractions actives de l'extrait cérébral, l'activité comparative des iso-antigènes, des hétéro- et même des auto-antigènes, ainsi que des essais de traitement préventif ou curatif.

Ajoutons, enfin, qu'une leuco-encéphalite démyélinisante a été réalisée par Oeriu, Stroesco, Nereantiu et Carp [44] dans des conditions rappelant celles vues chez l'homme. Des chiens vaccinés à titre prophylactique contre la rage, donc ayant reçu de la substance cérébrale, ont présenté ce syndrome clinique et histopathologique à l'occasion d'une méningite tuberculeuse expérimentale, ce qui prouverait que les accidents post-vaccinaux risquent de se produire plus facilement chez des organismes atteints d'une infection préexistante, subaiguë ou chronique. Voisin [47] estime d'ailleurs qu'un organisme tuberculisé se sensibilise beaucoup plus facilement qu'un autre à un antigène quelconque.

Dans nos propres recherches, nous avons essayé de préciser le mécanisme pathogénique de l'encéphalomyélite dite « allergique » et d'entreprendre des investigations en vue de prévenir ce syndrome nerveux [3].

1. — DISSOCIATION DES FACTEURS ACTIFS DU COMPLEXE ENCÉPHALITOGÈNE.

Le complexe encéphalitogène « CLOB » est constitué par un mélange de suspension cérébrale (C), enrobée de lanoline (L) et d'huile de paraffine (O), et de bacilles tuberculeux tués, virulents ou BCG (B).

Technique de préparation. — Le complexe CLOB a été préparé, en l'absence des émulsifiants synthétiques « Aquaphore » ou « Falba »

utilisés par d'autres auteurs, simplement par le mélange en mortier de 25 ml de lanoline, liquéfiée au bain-marie à 100°, avec 500 mg de bacilles tuberculeux humides essorés sur papier filtre (virulents ou BCG), autoclavés à 120° pendant trente minutes. On ajoute 50 ml d'huile de paraffine goutte à goutte et ensuite le mélange a été additionné, par petites fractions, de 25 ml de suspension aqueuse de substance nerveuse à 5 p. 100 (cerveau normal de mouton ou vaccin antirabique phéniqué tué, préparé sur le mouton). Au moment de l'injection, il faut liquéfier le complexe CLOB au bain-marie à 56°.

Les cobayes reçoivent, en une ou deux injections dans les muscles de la nuque, 0,5 ou 1 ml du complexe CLOB et sont gardés en observation pendant au moins six semaines.

Pour identifier les fractions actives du complexe CLOB, nous avons effectué trois expériences avec des mélanges CB, CLO ou LOB, en comparaison avec le mélange complet CLOB (tableau I).

TABLEAU I.

Mélanges	Expérience I		Expérience II		Expérience III	
	Cobayes traités	Signes nerveux	Cobayes traités	Signes nerveux	Cobayes traités	Signes nerveux
CB	13	0	24	0	—	—
CLO	11	0	—	—	—	—
LOB	8	3(37%)	26	10(38%)	18	3(16%)
CLOB	13		30	29(96%)	42	27(64%)

Ni la fraction CB, ni la fraction CLO du complexe CLOB ne se sont montrées encéphalitogènes. Au contraire, la fraction LOB (ne contenant pas d'antigène nerveux) a provoqué l'encéphalomyélite démyélinisante, en proportions bien moindres il est vrai que le complexe CLOB, mais néanmoins assez importantes.

Le rôle de la substance cérébrale apparaît donc favorisant, mais nullement indispensable pour la production de l'encéphalomyélite expérimentale démyélinisante. Le tissu nerveux s'est révélé pathogène seulement lorsqu'il a été associé à l'huile minérale, à la lanoline et au BCG tué. Si la fraction LOB, exempte d'antigène cérébral, a cependant provoqué le syndrome caractéristique, ceci doit être vraisemblablement mis sur le compte des altérations tissulaires provoquées au niveau des méninges et du névraxe par les bacilles tuberculeux tués enrobés de paraffine. On sait d'ailleurs qu'à la suite d'un trouble métabolique, d'une infection microbienne ou virale, d'un processus néoplasique, d'une infestation parasitaire, etc., une substance peut devenir antigène, même si elle fait partie intégrante et constitutive de l'organisme [8]. Par cette déviation de leur destinée, les protéines propres des tissus, ainsi « dénaturées », se transforment en « auto-antigènes » capables

d'engendrer l'état « d'auto-allergisation ». Dans le cas de la fraction LOB (bacilles tuberculeux tués, enrobés de paraffine et de lanoline, sans antigène cérébral), il s'agirait probablement d'une encéphalomyélite également allergique, dont le mécanisme pourrait être mis sur le compte d'un auto-antigène nerveux. Dans ce cas, le névraxe lui-même a pu être modifié, « dénaturé » à l'occasion et sous l'influence directe des lésions inflammatoires et destructives des méninges. Par conséquent, la barrière hémato-encéphalique a été profondément ouverte, pour aboutir aux altérations vasculaires thrombotiques et inflammatoires capables d'engendrer des processus pathologiques nerveux importants, telles la démyélinisation, la satellitose et la neuronophagie. Cette interprétation de la pathogénie « allergique » de l'encéphalomyélite provoquée par la fraction LOB ne représente d'ailleurs qu'une simple hypothèse.

II. — ASPECTS HISTOPATHOLOGIQUES DE L'ENCÉPHALOMYÉLITE EXPÉRIMENTALE PROVOQUÉE PAR LES MÉLANGES CLOB OU LOB.

On sait que les bacilles tuberculeux morts, enrobés dans l'huile de paraffine (fraction OB), produisent des phénomènes locaux inflammatoires, du type tuberculeux, avec dispersion dans les ganglions régionaux, dans les poumons et dans le foie. Au contraire, les mêmes bacilles morts, en suspension aqueuse (fraction B), ne produisent de lésions qu'au lieu même où on les dépose, sans métastases dans les organes, tandis que l'huile de paraffine seule (fraction O) n'appelle que quelques macrophages et des cellules géantes à corps étrangers, sans lésions nodulaires [4, 13, 15]. Les altérations histologiques de l'encéphalomyélite expérimentale, provoquées par le complexe CLOB ou par la fraction LOB, sont constituées par une réaction inflammatoire caractéristique des lésions tuberculeuses en général et, dans le névraxe, par des altérations vasculaires avec réaction inflammatoire lympho-histiocytaire, ischémie, démyélinisation, satellitose et neuronophagie. Ces dernières altérations ne font que s'encadrer dans le processus histopathologique généralisé, parti des muscles de la nuque, point d'injection du complexe encéphalitogène, disséminé ensuite dans tous les organes, jusqu'aux méninges et au système vasculaire du névraxe.

A. ALTÉRATIONS TISSULAIRES AU LIEU D'INJECTION DES MÉLANGES CLOB OU LOB. — Dans les muscles de la nuque, où ont été injectés les mélanges encéphalitogènes, on trouve des amas d'huile, chargés de bacilles tuberculeux et entourés de polynucléaires, le plus souvent pseudoéosinophiles, et de monocytes

(fig. 1). Entre les fibres musculaires on constate une infiltration intense de lymphocytes. Dans certaines fibres musculaires, les noyaux se multiplient, en se disposant d'abord en chapelets, pour

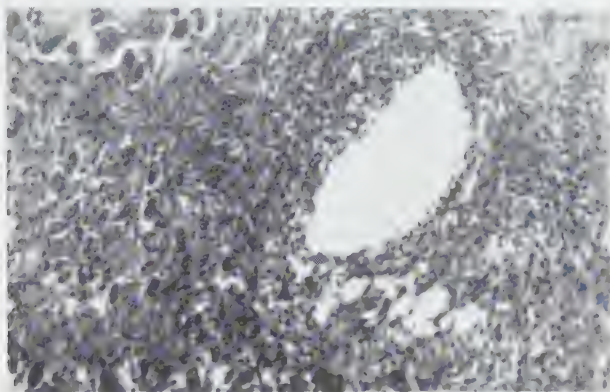


FIG. 1. — *Muscle de cobaye*. Lieu d'injection du complexe CLOB. Vésicule d'huile, dont les parois sont constituées par des polynucléaires ; fibres musculaires sectionnées transversalement ; **infiltration massive**.

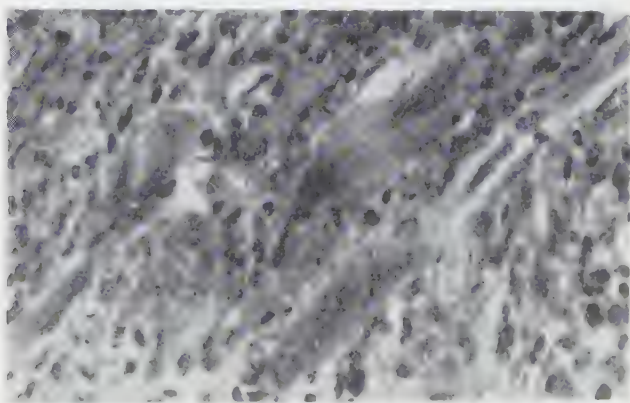


FIG. 2. — *Même préparation*. Fibre musculaire avec multiplication des noyaux, disposition en chapelets et transformation en géantocytes.

aboutir ensuite au stade de géantocytes (fig. 2). La masse inflammatoire est constituée, en général, par des nappes de cellules épithélioïdes, avec cellules géantes et lymphocytes, fréquemment disposées en nodules ; cette réaction inflammatoire est remplacée ultérieurement par une réaction scléreuse à fibroblastes.

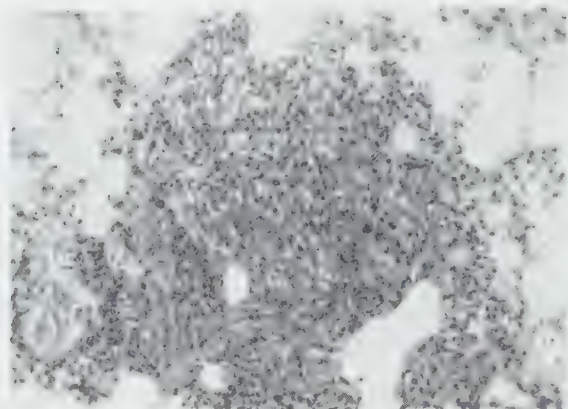


FIG. 3. — *Poumon de cobaye*. Nodule tuberculeux, constitué par des cellules épithélioïdes, lymphocytes et cellules géantes, produit par le complexe encéphalitogène CLOB.



FIG. 4. — *Poumon de lapin*. Pneumonie caséuse (CLOB intramusculaire).

B. ALTÉRATION DANS LES ORGANES. — Les ganglions lymphatiques, le foie, la rate et les poumons sont le siège de processus inflammatoires à caractère tuberculeux : nodules isolés ou confluents, composés de cellules épithélioïdes et de lymphocytes, avec ou sans cellules géantes (fig. 3). Macroscopiquement, et cela surtout chez le lapin, on trouve une pneumonie caséuse



FIG. 5. — *Moelle de cobaye*. Méningite avec adhérence des racines nerveuses à la moelle. Processus inflammatoire dans le parenchyme médullaire à la suite de l'injection musculaire du complexe encéphalitogène CLOB.

(fig. 4), pareille à celle décrite par Couland [4], par Rist [13], par Saenz et Canetti [15] et par d'autres, chez des animaux injectés avec des bacilles tuberculeux tués, enrobés dans de la paraffine.

C. RÉACTION MÉNINGÉE. — A certains niveaux médullaires, l'infiltration méningée est quelquefois compacte, aboutissant à la formation d'un bloc massif englobant les racines nerveuses, les ganglions spinaux, les méninges et la moelle (fig. 5). Ici, comme

dans les organes, on distingue le même aspect tuberculeux : placards de cellules épithélioïdes et de lymphocytes, avec de rares cellules géantes. Les amas caractéristiques d'huile y sont également présents, jusqu'aux abords des ganglions spinaux (fig. 6).

D. LÉSIONS DU NÉVRAXE. — Les altérations du parenchyme nerveux s'étendent à la fois aux substances blanche et grise de la

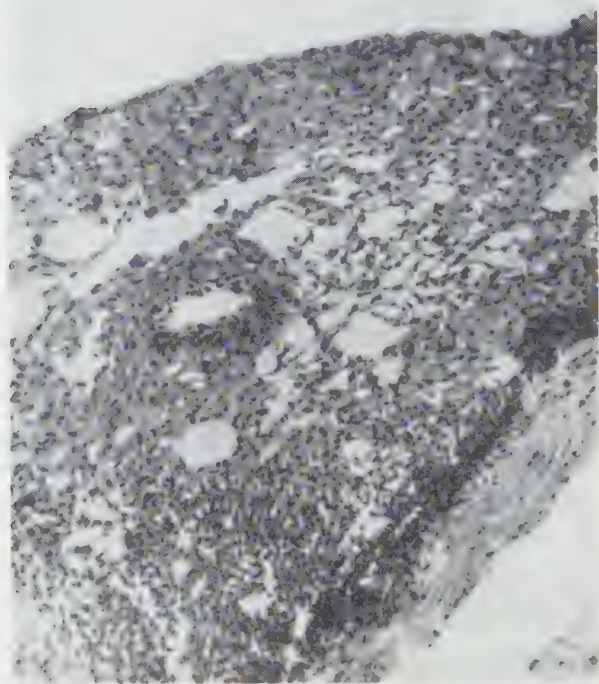


FIG. 6. — *Moelle de lapin*. Placard méningé constitué par des cellules épithélioïdes et lymphocytes, avec vésicules d'huile (CLOB intramusculaire).

moelle et du cerveau et sont caractérisées par des processus d'infiltration, par des lésions des neurones, des lésions démyélinisantes ou ischémiques.

Processus d'infiltration. — Les vaisseaux, veines et capillaires, sont devenus le siège d'altérations endovasculaires, thrombotiques, et de réactions périvasculaires intenses, comprenant de volumineux manchons histiocytaires (fig. 7). Le même processus d'infil-

tration se voit dans les ventricles cérébraux et se trouve disséminé dans le parenchyme de la moelle et de l'encéphale (fig. 8). à la fois dans la substance blanche et grise, soit les cornes anté-

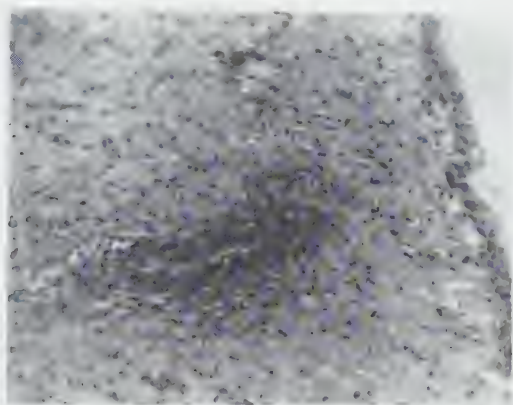


FIG. 7. — Cerveau de cobaye. Manchon périvasculaire et infiltration sous-ventriculaire après l'injection musculaire du complexe encéphalitogène CLOB.



FIG. 8. — Cerveau de cobaye. Zone ventriculaire. Processus inflammatoire et manchons périvasculaires (CLOB par voie musculaire).

rieures, les noyaux centraux ou la corne d'Ammon (fig. 9), c'est-à-dire partout où il y a des vaisseaux.

Altérations des neurones. — Le plus souvent les altérations des neurones sont du type ischémique, les cellules nerveuses ont un aspect « lavé » (chromatolyse et pycnose nucléaire). On voit

des plaques descriptives, lésions secondaires aux thromboses et aux troubles circulatoires fonctionnels déterminés par l'inflammation. Le processus de neuronophagie est constant, surtout dans les cornes antérieures de la moelle : satellitose d'abord, neuronophagie, puis, dans les cas graves, formation de corps de CLOB.



FIG. 9. — Moelle péronnière. Processus inflammatoire dans la corn. 2° lumbosac.



FIG. 10. — Moelle de cobaye. Neuronophagie (CLOB par voie musculaire).

phagie, cette moelle (fig. 10), jusqu'à la formation des corps glauques remplaçant les neurones disparus.

Lésions démyélinisantes. — Ces lésions se trouvent dans la moelle et dans le cerveau, dans la substance blanche empiétant sur la substance grise. Dans le cerveau, les lésions, en général moins importantes que celles de la moelle, se retrouvent du bulbe

jusque dans les hémisphères. Les plaques de démyélinisation ont au centre un vaisseau, d'habitude une veine, souvent thrombosé, entouré d'un manchon constitué par des éléments lympho-histio-cytaires dans l'espace de Virchow-Robin et, dans le tissu nerveux voisin, il y a infiltration d'éléments microgliaux et névrogliques.

Lésions ischémiques. — Celles-ci se présentent sous deux aspects. D'une part, des foyers de ramollissement situés dans la substance blanche de la moelle et du cortex cérébral, se présentant sous l'aspect de pâleur myélinique à limites nettes, et se distinguant ainsi des démyélinisations diffuses. D'autre part, on trouve dans la moelle, le bulbe, le cortex cérébral et ailleurs des plages de cellules nerveuses montrant des altérations ischémiques, et l'aspect « lavé » des neurones, identiques aux lésions décrites par Alajouanine et Hornet dans les troubles circulatoires du cerveau.

Somme toute, on peut affirmer qu'on a ainsi réalisé une vraie « polio-leuconévrite », dénomination par laquelle Levaditi [9] avait depuis longtemps désigné et classé les encéphalites post-infectieuses, d'après leurs affinités électives en rapport avec l'origine embryogénique du tissu nerveux.

III. — EFFETS DE LA DÉSENSIBILISATION

SUR L'APPARITION DU SYNDROME ENCÉPHALOMYÉLITIQUE EXPÉRIMENTAL.

Dans le cas du syndrome nerveux expérimental, deux facteurs pourraient jouer le rôle d'antigènes : la substance cérébrale (C) d'une part et les bacilles tuberculeux (B) du complexe encéphalito-gène CLOB de l'autre. Nous avons essayé une désensibilisation spécifique de l'organisme par chacun de ces deux facteurs, ainsi qu'une désensibilisation non spécifique par des antihistaminiques, tels le phénergan et le largactil (chlorpromazine).

A. DÉSENSIBILISATION SPÉCIFIQUE. — On connaît depuis longtemps l'action désensibilisante des doses élevées et largement répétées de tuberculine chez l'homme ou chez l'animal en état d'allergie tuberculinique [1, 2]. Notre dispositif d'expérimentation est relaté dans le tableau II.

L'intradermo-réaction, pratiquée seize jours après la première dose de CLOB, avec de la tuberculine diluée au 1/10, a mis nettement en évidence la désensibilisation tuberculinique chez les cobayes :

CLOB témoins (1) : ++, +, ++, +, 0, +, +, ++, +, +, ++, +, +, 0, + ;

(1) Intradermo-réaction à la tuberculine : + ; ++ = réaction positive ; 0 = réaction négative.

TABLEAU II.

Jours :	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
CLOB(ml)	0,5	-	-	-	Lot A.- Cobayes témoins										0,5	-	-	-	-	-
					Lot B.- Désensibilisation par tuberculine brute 1/5															
CLOB(ml)	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-
Tubercu- line(ml)	-	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
					Lot C.- Désensibilisation par tissu nerveux 5 p.100															
CLOB(ml)	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-
Tissu ner- veux(ml)	-	0,2	-	0,2	-	0,2	-	0,2	0,2	0,2	0,2	-	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

CLOB tuberculinisés : 0, 0, +, 0, 0, +, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0.

Ni la désensibilisation par la tuberculine, ni le traitement par de la substance nerveuse n'ont empêché l'apparition de l'encéphalomyélite (tableau III).

TABLEAU III.

Animaux désensibilisés	Nombre des cobayes	Symptômes nerveux	Cobayes restés normaux
Lot A (témoins)	26	13 (50%)	13 (50%)
Lot B (tuberculine)	26	15 (57%)	11 (42%)
Lot C (tissu nerveux)	10	7 -	3 -

B. SUBSTANCES ANTIHISTAMINIQUES. — Un groupe de 81 cobayes, de poids variant entre 350 et 500 g, a reçu une seule dose de 1 ml de mélange encéphalitogène CLOB ; 31 d'entre eux ont été traités, à partir du troisième jour, par un mélange de phénergan (0,25 mg) et de largactil (0,25 mg), injecté deux fois par jour, pendant quinze jours consécutifs. Les symptômes nerveux ont débuté, chez les traités et chez les témoins, après des incubations

TABLEAU IV.

Cobayes injectés avec CLOB	Nombre des cobayes	Symptômes nerveux	Cobayes restés normaux
Témoins	50	20 (40%)	30 (60%)
Phénergan + largactil	31	17 (54%)	14 (45%).

d'une durée à peu près égale. Dans ces conditions, les substances antihistaminiques (phénergan et largactil), non seulement n'ont pas protégé les cobayes contre l'action encéphalitogène du mélange CLOB, mais elles paraissent avoir exercé une action favorisante (tableau IV).

CONCLUSIONS.

Le rôle de la substance cérébrale du complexe encéphalitogène CLOB, composé de substance cérébrale (C), de lanoline (L), d'huile de paraffine (O) et de bacilles tuberculeux tués, virulents ou BCG (B), a une action favorisante, mais nullement indispensable pour la pathogénie de l'encéphalomyélite expérimentale démyélinisante dite « allergique ». Seule la fraction LOB y apparaît indispensable, alors que les fractions CB et CLO, injectées séparément, ne se sont jamais montrées pathogènes.

C'est grâce à la dissémination des amas d'huile minérale et de lanoline, chargés de bacilles tuberculeux tués (LOB), que se produisent des processus inflammatoires de type tuberculeux dans tous les organes, jusqu'aux méninges. A la suite de la destruction de la barrière hémato-encéphalique, occasionnée par la méningite ainsi provoquée, le névraxe entier — substances blanche et grise de la moelle et du cerveau — devient le siège d'altérations vasculaires, inflammatoires, démyélinisantes et neuronales, qui caractérisent l'encéphalomyélite expérimentale démyélinisante, elle-même une véritable « polio-leuconévrite » de Levaditi.

L'hypothèse qui attribue une nature allergique à l'encéphalomyélite expérimentale semble être démentie. En effet, non seulement on peut produire ce syndrome par le mélange encéphalitogène LOB, qui ne contient pas d'antigène nerveux, mais ni la désensibilisation de l'organisme par des doses massives et répétées de tuberculine ou de substance cérébrale, ni le traitement anti-allergique par des antihistaminiques (phénergan + largactil) n'ont pu protéger les cobayes contre l'action encéphalitogène du complexe CLOB.

Bien entendu, certains arguments semblent plaider en faveur de la nature allergique de l'encéphalomyélite démyélinisante, qu'elle soit post-infectieuse, post-vaccino-antirabique, ou provoquée expérimentalement par de la substance cérébrale additionnée des adjuvants de Freund. Nous pensons cependant que le problème de la pathogénie de ce syndrome nerveux n'est pas encore résolu.

SUMMARY

ROLE OF KILLED T. B. IN THE PATHOGENESIS OF SO-CALLED
« ALLERGIC » ENCEPHALOMYELITIS INDUCED BY BRAIN EXTRACT PLUS
FREUND'S ADJUVANTS.

Brain matter from the encephalitogenic complex CLOB (C, cerveau [brain]; L, lanoline; O, *Oleum paraffinae*; B, t. b.) plays a favouring but by no means indispensable part in the pathogenesis of experimental demyelinating « allergic » encephalomyelitis. Only the LOB fraction seems to be absolutely necessary,

whereas the CB and CLO fractions alone never proved pathogenic.

Inflammatory tuberculous processes are induced in all organs and even in the meninges by means of the dissemination of mineral oil and lanoline drops, carrying killed t. b. Following the destruction of the blood-brain barrier due to this meningitis, the whole C. N. S. (white and gray matter of the brain and spinal cord) presents vascular, inflammatory, demyelinating and neuronal alterations, which characterize the experimental demyelinating encephalomyelitis, quite comparable to Levaditi's poliomyelitis.

The authors' experiments do not support the hypothesis following which this encephalomyelitis would have an allergic origin.

It is true that certain arguments suggest the allergic nature of this encephalomyelitis (induced either by infection, or an irradic vaccination, experimental injection of brain matter + Freund's adjuvant), but in spite of these facts, the problem of the pathogenesis of this nervous syndrome is not yet solved.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOQUET (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 165 et 902.
- [2] BURNET (E.). *C. R. Soc. Biol.*, 1908, **65**, 307.
- [3] CONSTANTINESCO (N.), HORNET (Th.), BIRZU (N.), ZAVATE (O.), PENGEA (I.) et RUSAN (S.). *Studii si Cercetari stiintifice (Medicina)*, *Academia R. P. R., Filiala Iasi*, 1958, 1.
- [4] COULAUD (E.). *Rev. Tub.*, 1934, 850 ; 1935, 1181. *Bull. Acad. Méd.*, 1936, **115**, 232.
- [5] HALPERN (B.) BERTRAND (I.) et LHERMITTE (F.). *Presse méd.*, 1950, **58**, 684.
- [6] KABAT (E. A.), WOLF (A.) et BEZER (A. E.). *Science*, 1946, **104**, 362. *J. exp. Med.*, 1947, **85**, 117 ; 1948, **88**, 417 ; 1949, **89**, 395.
- [7] KREINDLER (A.), OLTEANU (I.) et CHIVU (V.). *Bul. Stiint. Acad. R. P. R., Seria St. Medicale*, 1950, **2**, 287.
- [8] LEMAIRE (A.) et DEBRAY (J.). *Les auto-anticorps en pathologie générale*, in [18].
- [9] LEVADITI (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1930, **45**, 673. *Travaux de Médecine expérimentale*, Paris, A. Marétheux et L. Pactat, édit., 1931, 50.
- [10] MORGAN (I. M.). *J. Bact.*, 1946, **51**, 614. *J. exp. Med.*, 1947, **85**, 135.
- [11] OERIU (S.), STROESCO (Gh.), NEREANTIU (F.) et CARP (N.). *Studii si Cercet. Inframicrob., Microb., Parazitol.*, 1952, **3**, 87.
- [12] REMLINGER (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1919, **89**, 1098 ; 1920, **90**, 171.
- [13] RIST (Noël). *L'allergie conférée par les bacilles tuberculeux morts enrobés dans les paraffines*, Paris, 1938.
- [14] RIVERS (T. M.) et SCHWENTKER (F. F.). *J. exp. Med.*, 1935, **31**, 689.
- [15] SAENZ (A.) et CANETTI (G.). *Presse méd.*, 1939, n° 42, 849.
- [16] SCHWENTKER (F. F.). *Analele Instit. V. Babes*, 1938, **9**, 202.
- [17] VOISIN (G.). *Les auto-anticorps cytotoxiques*, in [18], p. 225.
- [18] *Les maladies avec auto-anticorps. Rapports présentés au XXX^e Congrès français de Médecine, Alger*, 1955, Masson, édit., 1955.

LA RÉACTIVATION MULTIPLE DU BACTÉRIOPHAGE INACTIVÉ PAR VOIE PHYSIQUE ET CHIMIQUE

(TROISIÈME PARTIE)

par W. MUTSAARS (*).

*(Université libre de Bruxelles,
Faculté de Médecine et de Pharmacie,
Laboratoire de Bactériologie)*

I. — INFLUENCE FAVORABLE DE LA BASSE TEMPÉRATURE SUR LE RENDEMENT EN PLAGES DES MÉLANGES COLIBACILIE ET PHAGE FORMOLÉ.

Au cours d'un travail antérieur [1], nous avons signalé que l'incorporation de plus en plus tardive de phage partiellement inactivé par des radiations ultra-violettes à un mélange de colibacilles et de phage partiellement inactivé par le formol entraînait une chute de plus en plus accentuée du nombre de plages par rapport au témoin où phage irradié, phage formolé et germes sont mis en contact simultanément.

Cette différence de comportement nous a paru digne d'attention. Nous avons repris ces expériences, en faisant parallèlement deux séries d'essais, les uns menés à 38° au bain-marie, les autres dans un bain de glace fondante.

Nous avons utilisé le phage ϕ N et le coli W correspondant : les techniques d'irradiation et de formolisation ont été décrites [1]. Le phage ϕ N formolé est utilisé à la dilution 10^{-2} (dilution faite dans un liquide constitué de 9 parts d'eau physiologique et de 1 part de bouillon BHI [Difco Brain Heart Infusion]). Le phage ϕ N irradié est utilisé soit non dilué (expér. 1 à 5), soit dilué à 10^{-1} [expér. 6 à 10] (tableau I).

Deux séries parallèles de tubes sont établies ; ces tubes contiennent tous 2,5 ml de phage formolé, dilué à 10^{-2} . Aux tubes 1 de chaque série on ajoute successivement 2,5 ml de phage irradié, puis 5 ml d'une culture de coli W, âgée de 5 heures en BHI non

(*) Manuscrit reçu le 13 août 1958.

TABLEAU I.

Exp.	0°					38°				
	0 min.	3 min.	6 min.	9 min.	F	0 min.	3 min.	6 min.	9 min.	F
1	3490	3210	3505	2830	8,39	3295	895	585	520	1124
	233	165	255	176		123	55	35	71	
	6,98%	5,15%	7,28%	6,24%		3,76%	6,16%	6,1%	13,6%	
2	4400	3885	4015	3750	4,51	5560	3390	2635	2135	108
	410	257	290	87		418	211	247	55	
	7,33%	6,62%	7,44%	2,33%		7,52%	6,24%	9,41%	2,58%	
3	1930	1615	1325	1430	2,45	1715	560	610	525	560
	71	76	57	173		60	52	33	31	
	3,7%	4,75%	4,55%	12,13%		3,5%	6,1%	5,46%	5,88%	
4	1115	1460	1670	1340	8	4405	3480	2050	1730	873
	113	116	179	108		341	198	163	349	
	8,6%	8%	11,76%	8,14%		7,74%	5,43%	5,75%	27,2%	
5	114	100	150	175	15,9	1960	1510	1215	11	96
	95	110	111	33		136	130	110	12	
	8,37%	11,75%	7,36%	8,32%		11,67%	8,1%	8,95%	11,2%	
6	490	315	225	490	2,48	585	265	175	125	112
	117	21	33	76		60	22	13	16	
	24%	7,1%	15%	2,7%		10,35%	9,4%	13,2%	12,7%	
7	875	945	130	600	1,93	90	325	410	375	21
	65	124	232	120		53	210	42	19	
	7,43%	13,25%	27,9%	19,8%		5,91%	11,4%	11,7%	4,33%	
8	1575	690	685	730	21	740	415	345	230	85
	235	169	176	210		64	20	27	18,8	
	14,26%	24,61%	25,7%	28,8%		8,63%	5,73%	7,9%	6,8%	
9	865	835	765	940	1,3	850	565	485	310	146
	190	192	149	121		51,66	28,03	34,8	27,8	
	22%	23%	19,5%	12,95%		6,06%	4,9%	7,2%	6,96%	
10	2980	1750	1225	1110	26	4155	1875	1115	845	2957
	347	501	220	136		64	23,85	64	57	
	16,61%	28,65%	18%	12,25%		1,55%	1,27%	5,78%	6,81%	

Note. — Dans chaque case le chiffre supérieur représente la moyenne arithmétique de la somme des plages de bactériophagie comptées sur 5 boîtes de Petri. Le chiffre moyen indique l'écart type (racine carrée de la variance). Le chiffre inférieur indique en pourcentage le coefficient de variation. Dans les colonnes marquées F se trouve inscrit le résultat du « F test ». Il s'obtient en calculant la variance totale de toutes les boîtes de Petri envisagées : S^2 , en retranchant la variance entre deux ou plusieurs groupes de 5 boîtes de Petri : S_1^2 , on obtient ainsi la variance à l'intérieur des groupes : $S^2 - S_1^2 = S_2^2$. $F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$. Pour le tableau I et l'expérience à 0 (par exemple), il y a quatre groupes de 5 boîtes. Pour la variance totale nous avons donc 19 degrés de liberté (n). Pour la variance entre les groupes : 3 degrés (n_1). Pour la variance à l'intérieur des groupes : 16 (n_2). D'après les tables et pour $n_1 = 3$ et $n_2 = 16$, la sécurité à 99 p. 100 est donnée par 5,29. Pour les autres tableaux : deux groupes de 5 boîtes de Petri : $n_1 = 1$ et $n_2 = 8$ F (sécurité 99 p. 100) est de 11,26.

dilué. Les tubes 2, 3 et 4 de chaque série ne diffèrent des tubes 1 que par le moment d'addition du phage irradié, addition qui s'effectue respectivement après trois, six et neuf minutes de contact entre le phage formolé et la suspension de germes. Selon la série, les tubes séjournent dix minutes à 0° ou à 38°. Les titrages se font dix minutes après le début de l'expérience, au

moyen de prélèvements de 0,9 ml en quintuple exemplaire, traités selon la méthode de Gratia. Les boîtes de Petri sont immédiatement portées à l'étuve à 38°. On évite de les empiler.

Les témoins suivants sont établis :

A. Des tubes contenant 2,5 ml de phage formolé dilué à 10^{-2} + 2,5 ml de bouillon BHI dilué au 1/10. Après addition de 5 ml de culture de coli W, ces tubes séjournent soit à 0°, soit à 38° pendant les dix minutes précédant leur titrage. De plus, de deux tubes analogues, l'un séjourne d'abord pendant cinq minutes à 0°, puis pendant cinq minutes à 38°, l'autre étant traité de façon inverse.

B. Des tubes contenant 2,5 ml de phage irradié non dilué (exp. 1 à 5) ou dilué 10^{-1} (exp. 6 à 10) + 2,5 ml de bouillon BHI dilué. Après addition de 5 ml de culture de coli W ces tubes séjournent également soit à 0°, soit à 38° pendant dix minutes.

C. Il est de plus fait pour chaque essai une numération des germes de la culture de coli W et une numération des particules de phage à partir du stock non traité.

TABLEAU II.

Exp.	I	II	F	III	IV	F	Quet. phage/ germes
	0/38	38/0		38°	0°		
I	- - -	- - -	- - -	I80 I4 8.1%	785 235 30%	25	0.045
2	375 98 26%	245 25 10.40%	6.7	330 16 4.3%	I045 I52 14.6%	86	0.02
3	74.4 9.27 I2.46%	60.2 7.5 I2.4%	5.6	77 I7 22%	355 I01 28%	293	0.05
4	205 31.2 15.3%	I70 22 I3%	2.94	I45 16 II%	675 I91 28%	30	0.1
5	87.2 I2 I4.4%	85.6 5.5 6.5%	I7 $S^2_1 < S^2_2$	68 5.3 7.8%	300 I06 35%	I6.8	0.06
6	74.2 I9 26.5%	61.8 14.3 23%	I.02	42.2 6.7 I6%	560 I01 18%	91	0.06
7	I50 I8 I2.2%	I65 10 6%	2.15	I85 18 9.3%	420 98 23%	24	0.02
8	I70 24 I4%	200 39.8 I9.7%	I.84	I15 15 I3%	I180 I19 10%	249	0.04
9	I09.8 31 28.2%	III 31.7 28.5%	253 $S^2_1 < S^2_2$	95.6 15 I6.3%	I410 443 31%	34	0.04
IO	I95 23 II.7%	215 14 6.6%	2.14	405 22 5.5%	540 I32 24%	22	0.05

Les résultats des témoins du groupe A sont exposés au tableau II, ceux des témoins du groupe B au tableau III (Voir note).

TABLEAU III.

Exp.	38°	0°	quot. /germes	F
I	7,6	6,6	2	5,9
2	510	360	2	13,3
	117	14,9		
	23,1%	4,1%		
3	425	90	5,26	704
	19,7	7,28		
	4,62%	8,13%		
4	3060	175	10	966
	185	14,1		
	6%	8%		
5	1480	105	6,6	3140
	48,8	3,8		
	3,3%	3,62%		
6	5,2	3,6	0,62	2,3
7	8,8	6,3	0,2	4
8	7,4	6,8	0,45	9
9	104	108	0,45	1,9
10	19,6	8,2	0,58	35

Les résultats expérimentaux exposés au tableau I montrent que la régression du nombre de plages par addition tardive du phage irradié est parfois nulle et toujours moins forte quand le contact avec les germes s'opère à 0° plutôt qu'à 38°.

Au cours des cinq premières expériences, on ajoute à du phage formolé dilué à 10^{-2} et du coli W, du phage irradié non dilué, respectivement après zéro, trois, six et neuf minutes de séjour à 0° ou à 38°. Prenant les chiffres de la minute zéro pour 100 p. 100, le nombre de plages est à 0° de 87 p. 100 (3 mn), 90 p. 100 (6 mn) et 80 p. 100 (9 mn). A 38° on obtient respectivement 60, 46 et 35 p. 100. Les essais 6 à 10 comportent l'utilisation de phage irradié dilué à 10^{-1} . A 0° on a un nombre de plages correspondant à 68 p. 100 (3 mn), 55 p. 100 (6 mn) et 57 p. 100 (9 mn) ; à 38° les chiffres sont de 47, 34 et 26 p. 100.

L'examen des titrages des témoins du groupe A [phage formolé] (tableau II) permet de constater que le contact entre colibacilles et phage formolé, à 0° et en milieu liquide, aboutit à un nombre de plages nettement plus élevé que si l'on mène la même réaction à 38°. A 38° on n'obtient en moyenne que 25 p. 100 du nombre de plages à 0° (exp. 1 à 5) ou même 20 p. 100 (exp. 6 à 10).

Le séjour à 38° du mélange germes et phage formolé est donc

fatal pour un grand nombre de particules qui, à 0°, se montrent capables de produire des plages. L'examen des titrages provenant des tubes ayant subi un traitement mixte (séjour à 0° et à 38° ou inversement) montre que la lésion due au séjour à 38° est irréversible, elle ne peut être réparée par un séjour à 0° ; d'autre part, un séjour à 0° ne protège pas des effets d'un séjour ultérieur à 38°.

Le quotient phages-germes a été calculé d'après la numération du phage non formolé et des germes (tableau II). Le quotient le plus élevé étant de 0,1, nous pouvons écarter toute réactivation due à une multiplicité d'infection.

Pour expliquer la diminution de rendement en plages par l'apport tardif du phage irradié on aurait pu recourir à l'hypothèse suivante. Le matériel génétique du phage formolé, tout en étant incapable de parcourir au sein du colibacille un cycle complet mettant en liberté des particules infectantes, pourrait tout au moins entamer ce cycle. Il est d'autre part vraisemblable que la réactivation par du matériel génétique issu de phage irradié ne peut se faire que si les éléments nécessaires participent depuis le début au développement. Le matériel formolé ayant entamé son processus reproductif s'engagerait dans une impasse d'où l'apport tardif de matériel irradié ne lui permettrait plus de sortir.

La basse température, freinant les processus métaboliques et même la pénétration du matériel génétique, conserverait donc au matériel formolé son aptitude à se laisser réactiver par le matériel irradié. Mais si cette hypothèse était exacte, le nombre de plages des témoins du groupe A devrait être à peu près identique et indépendant de la température à laquelle les témoins ont été soumis. En effet, comme il s'agit uniquement de phage formolé, l'effet du séjour à basse température ne peut être que retardateur. Les germes infectés étant tous en dernière analyse placés à 38° en milieu gélosé, le matériel génétique indemne pourra à ce moment présider à l'élaboration de particules neuves, le matériel génétique lésé ne le pourra pas.

Pour des raisons analogues, on ne peut admettre l'hypothèse d'une pénétration de matériel génétique formolé, déterminant l'exclusion du matériel irradié par un phénomène de réimperméabilisation de la membrane microbienne (resealing mechanism de Puck et Lee).

Pourquoi la différence entre les mélanges du groupe témoin A placés initialement à 0° et à 38° est-elle décelable, puisque les divers prélèvements séjournent tous pendant dix-sept heures à 38°, à vrai dire en milieu gélosé et non en milieu liquide ? Nous ne pouvons répondre à cette question.

Les résultats obtenus avec le groupe témoin B (phage irradié) sont exposés au tableau III. Pour les cinq premiers essais, et en admettant une fixation complète du phage irradié non dilué, la multiplicité d'infection varie entre 60 p. 100 et 99,5 p. 100 des germes. Il existe donc certainement une possibilité de réactivation multiple homologue. Pour les essais 6 à 10, le phage irradié ayant été dilué à 10^{-1} , les pourcentages d'infection multiple sont compris entre 1,9 et 11 p. 100 et les possibilités de réactivation en sont réduites d'autant. Quand ces possibilités sont minimales, les mélanges séjournant en milieu liquide ne sont guère influencés par la température. Il n'en est pas de même quand les chances d'infection multiple augmentent : dans ce cas l'influence favorable du séjour du mélange à 38° est évidente.

II. — INFLUENCE FAVORABLE DU SÉJOUR A 42°
SUR LE RENDEMENT EN PLAGES DES BOÎTES DE PETRI
CONTENANT DES MÉLANGES DE PHAGE FORMOLÉ
ET DE GERMES CORRESPONDANTS.

On réalise l'expérience suivante :

1° On mélange 6 ml d'une dilution appropriée (10^{-4}) de phage formolé titrant primitivement $1,25 \times 10^{10}$ particules au millilitre à 6 ml d'une jeune culture de coli W. Les deux tubes ont été maintenus préalablement dans un bain de glace fondante et le mélange y séjourne également pendant dix minutes. A ce moment on titre selon la méthode de Gratia, et, avec 10 prélèvements de 0,9 ml on prépare 10 boîtes de Petri identiques. Cinq de ces boîtes séjournent pendant une nuit à l'étuve à $37^{\circ}5$ (série 1 a), les cinq autres (série 1 b), après séjour de une heure trente à 42° , rejoignent les boîtes de la série 1 a.

2° Un mélange identique est fait à partir de phage et de colibacilles à 38° . Ce mélange est maintenu à cette température pendant dix minutes et ensuite procédant comme en 1°, on constitue deux séries de boîtes de Petri, 2 a et 2 b, cette dernière ne différant de la première que par un séjour de une heure trente à 42° .

Nous avons donc quatre lots de boîtes de Petri, provenant de mélanges de phage formolé et de coli W rigoureusement identiques, ne différant que par les traitements thermiques subis : séjour à 0° ou à 38° pour les mélanges liquides, séjour à 42° ou non pour les boîtes de Petri.

Les résultats sont exposés au tableau IV. Les rapports phage/germes permettent d'exclure les infections multiples. L'effet favorable de cette thermo-réactivation, déjà net pour les séries 2 b par rapport aux séries 2 a, est encore plus évident pour les séries 1 b par rapport aux séries 1 a. Pour les séries 1 (mélanges liquides à 0°) le nombre de plages est multiplié par

un facteur allant de 1,7 à 3,57 ; pour les séries 2 (mélanges liquides à 38°) ce facteur varie entre 1,15 et 1,56, les moyennes étant respectivement de 2,85 et de 1,36. L'examen des séries extrêmes montre qu'un séjour du mélange liquide phage formolé-germes à 0°, suivi du séjour des boîtes de Petri à 42°, multiplie le nombre de plages par un facteur de 4,96 à 11,2 avec une moyenne de 8,1, par rapport au nombre de plages trouvé à la suite du séjour du mélange liquide à 38° suivi de celui des boîtes de Petri à 37°5.

TABLEAU IV.

Exp.	Mélange liquide à 0°			Mélange liquide à 38°			
	A Etuve 37°.5	B Etuve 42°	F	A Etuve 37°.5	B Etuve 42°	F	Rapport phage /germes
I	755 102 13.4%	1720 491 28.5%	14.8	270 13 4.8%	350' 40.5' 11.6%	8	0.003
2	805 210 26%	2575 621 24%	29	280 18 6.5%	435 57 13.2%	26	0.0025
3	935 230 32%	3145 930 29.5%	16.3	325 28 8.7%	450 48.8 10.8%	22	0.0035
4	2570 461 17.9%	4405 745 16.9%	34	565 13 2.3%	720 92 13%	39	0.007
5	535 53 10%	1795 444 24%	31	125 7.9 6.3%	170 30.3 17.7%	8.5	0.002
6	500 31.3 6.24%	1515 633 41.8%	13.3	305 23.6 7.7%	445 54.38 12.3%	216	0.002
7	110 57.5 8.1%	2540 999.95 39.36%	13.64	340 29.1 8.58%	395 27.6 7%	6.9	0.0014
8	280 43.1 15.28%	675 276 41%	7.7	130 10.14 7.92%	185 27.5 14.88%	14.9	0.0017

Les résultats de l'expérience précédente nous ont incité à comparer les effets thermiques sur le rendement en plages des colibacilles mis au contact : a) de mélanges de phage inactivé par le formol et inactivé par les radiations ultra-violettes ; b) de phage inactivé par le formol ; c) de phage inactivé par les rayons ultra-violets. En plus des numérations de germes et de particules de phage qui permettent d'établir les quotients phage/germes, on prépare les mélanges suivants :

A. Quantités égales de phage inactivé par le formol et de phage irradié.

B. Quantités égales de phage inactivé par le formol et de bouillon BHI dilué au 1/10.

C. Quantités égales de phage irradié et de bouillon dilué au 1/10. Des tubes contenant respectivement 5 ml des mélanges A, B ou C, sont placés soit à 0°, soit à 38°. On ajoute à chacun de ces tubes 5 ml d'une culture jeune de coli W. Après dix minutes de contact on répartit 10 prélèvements de 0,9 ml chacun de chaque tube dans 10 boîtes de Petri. Cinq de ces boîtes sont placées dans une étuve à 42° et vont rejoindre, après séjour de une heure trente, les cinq autres boîtes placées dans l'étuve à 37°5.

En résumé, et pour chacun des trois mélanges, on dispose de 4 lots de 5 boîtes de Petri, contenant des plages de bactériophagie issues de mélanges de germes et de phages ayant subi les traitements suivants :

Lot 1 : séjour du mélange en milieu liquide à 0°, séjour en milieu gélosé à 37°.

Lot 2 : séjour du mélange en milieu liquide à 0°, séjour en milieu gélosé à 42° (une heure trente).

Lot 3 : séjour du mélange en milieu liquide à 38°, séjour en milieu gélosé à 37°.

Lot 4 : séjour du mélange en milieu liquide à 38°, séjour en milieu gélosé à 42° (une heure trente).

Les résultats de 5 essais sont exposés au tableau V. En ce qui concerne les mélanges de type C, ne comportant que du phage irradié, on retrouve dans certaines expériences l'action favorable du séjour des mélanges en milieu liquide à 38°, les boîtes des lots 3 et 4 des essais 3 et 4 ont un nombre de plages nettement supérieur à celui des boîtes de lots correspondants 1 et 2. Pour les essais 1, 2 et 5, le nombre de plages est insuffisant. D'autre part, le séjour en milieu gélosé à 42° n'a aucun effet sur le nombre de plages.

Pour les séries B, ne comportant que du phage formolé, nous retrouvons en somme des résultats analogues à ceux exposés au tableau IV : influence favorable du séjour du mélange en milieu liquide à 0° : le nombre de plages des lots 1 est supérieur à celui des lots 3, celui des lots 2 à celui des lots 4 ; le nombre de plages des lots 2 est supérieur à celui des lots 1, celui des lots 4 à celui des lots 3.

Examinons à présent les mélanges du type A : phage formolé et phage irradié. A condition que le contact initial entre les cellules microbiennes et les phages inactivés se soit fait à 38°

TABLEAU V.

Milieu liquide 0°			Milieu liquide 38°			Quot. phage/germes
Etuve 37°5	Etuve 42°	F	Etuve 37°5	Etuve 42°	F	
A 620 114 18.4%	1375 220 16%	33.6	730 34 4.6%	725 91 12.6%	$S \frac{2}{2} = 3I$ $S \frac{2}{I}$	-
I B 380 82 21.6%	1225 118 9.6%	136	193 12 6.2%	250 17 7.1%	33	0.001
C 1.6	1.4	-	1.4	1.8	-	1.1
A 270 16 5.9%	505 91 18.1%	25	455 36 8.1%	655 56 8.5%	35.8	-
II B 190 29 15.6%	655 125 19.1%	53.14	125 10 8.25%	200 27 13.7%	24.6	0.001
C 4.4	2.2	-	7.6	11.2	-	I
A 475 58 12.3%	680 86 12.7%	15.9	1160 44 3.8%	1180 34 2.9%	$S \frac{2}{2} = 3.4I$ $S \frac{2}{I}$	-
III B 280 55 19.8%	620 90 14.5%	41	260 5 2.1%	310 34 11.25%	8	0.0009
C 34.2 6 17.5%	38.4 5 13%	1.14	120 7 5.8%	170 68 39.9%	2.25	0.95
A 675 59 8.8%	1400 61 4.4%	2.85	2270 29 1.3%	2060 220 10.7%	3.57	-
IV B 865 52 6%	1635 371 22.8%	166	420 36 8.8%	665 30 4.6%	105	0.001
C 8	7	-	40	34.8	-	1.36
A 95 9.6 10%	130 21 16%	9	250 17 7%	285 26 9.3%	3.59	-
V B 34.4 5 14.5%	83.4 16 19%	34.57	39.2 13 34.8%	40.4 5 12.6%	1.8	0.0008
C 32 2.45 7.6%	42 7.5 17.8%	3.54	48 4.3 9%	46.6 3.6 7.7%	$S \frac{2}{2} = 6.76$ $S \frac{2}{I}$	0.86

(lots 3 et 4), le rendement en plages est nettement supérieur à celui obtenu par l'utilisation des phages formolés et irradiés pris isolément; ceci ne fait que confirmer ce qui a été exposé précédemment [1, 2]. Cependant, le séjour des boîtes à 42° n'améliore en aucune façon le rendement.

Si le contact initial a lieu à 0° (lots 1 et 2), le séjour des boîtes à 42° améliore significativement le rendement en plages.

Comparant les rendements des séries A (lot 1) avec les lots correspondants des séries B et C, nous constatons qu'ils sont supérieurs à la somme des rendements de ces deux séries. Ceci

n'est pas le cas pour le lot 2. A lui seul, le nombre de plages des boîtes de la série B de ce lot atteint celui de la série A.

Dans les conditions du lot 2, la réactivation hétérologue ne permet pas de dépasser celle obtenue par la réactivation thermique à 42° du phage formolé. Comme le séjour en milieu liquide a des effets inverses selon l'utilisation de phage formolé ou irradié et que ces effets interviennent vraisemblablement aussi dans le cas de la réactivation hétérologue, comme d'autre part, la réactivation thermique par séjour à 42° est surtout nette, en ce qui concerne le phage formolé, pour les mélanges placés initialement à 0°, comme enfin cette réactivation thermique ne paraît pas exister pour le phage irradié, le résultat de la réactivation hétérologue dépend plus ou moins de la résultante de ces effets opposés.

III. — ESSAIS DE RÉACTIVATION HÉTÉROLOGUE DE PHAGE INACTIVÉ PAR LES RAYONS ULTRA-VIOLETS ET DE PHAGE INACTIVÉ PAR DIVERS TRAITEMENTS PHYSIQUES ET CHIMIQUES.

Nous n'avons observé aucune réactivation dans des mélanges de phage irradié par les rayons ultra-violet et de phage inactivé partiellement par le sublimé, pas plus que dans des mélanges de phage irradié et de phage partiellement inactivé par le peroxyde d'hydrogène (perhydrol Merck). Les mélanges de phage formolé et de phage traité par le sublimé, de phage formolé et de phage traité par le perhydrol n'ont pas donné lieu à réactivation. Le phage partiellement inactivé par chauffage de trente minutes à 67°5 (titre passant de $1,8 \times 10^8$ à 9×10^3) n'est pas réactivable par le phage formolé.

Le phage inactivé partiellement par la ninhydrine est réactivable par le phage irradié.

Nous avons utilisé une solution de ninhydrine à 3,3 p. 100 en eau distillée. Un tube contenant 4,5 ml de phage φ N titrant $3,6 \times 10^9$ particules par millilitre reçoit 0,4 ml d'eau distillée et 0,1 ml de la solution de ninhydrine. Ce mélange est immergé en tube scellé dans un bain-marie à 38° et y séjourne cinq heures. Le temps d'action réduit le titre du phage φ N de 10^9 à 10^4 particules par millilitre. A deux tubes contenant chacun 2,5 ml de phage ninhydriné dilué à 10^{-2} on ajoute respectivement 2,5 ml de phage traité par les rayons ultra-violet, non dilué, et 2,5 ml de ce même phage dilué à 10^{-1} .

A trois tubes témoins contenant chacun 2,5 ml de bouillon BHI dilué au 1/10 on ajoute respectivement 2,5 ml de phage ninhydriné dilué à 10^{-2} , 2,5 ml de phage irradié non dilué et 2,5 ml de phage irradié dilué à 10^{-1} . Il est fait une numération de la culture de

coli W utilisée et une numération des particules de phage non traité. Chacun des tubes reçoit 5 ml d'une culture jeune de coli W : les titrages se font après séjour des mélanges pendant dix minutes au bain-marie à 38°. Les résultats de 9 essais sont exposés au tableau VI. En général, la réactivation obtenue est moins nette dans les mélanges contenant du phage irradié non dilué, le rendement en plages des mélanges de phage ninhydriné et de phage irradié dilué à 10^{-1} étant proportionnellement supérieur. Les différences entre les sommes des plages obtenues avec le phage ninhydriné seul et le phage irradié dilué à 10^{-1} seul (14,8 + 1 pour l'essai 1) et le total des plages obtenu avec le mélange correspondant (110 pour l'essai 1) sont statistiquement

TABLEAU VI.

	/Irrad. seul non dil.	/Irrad. seul ₂ dil. 10^{-2}	/Ninh. seul	/Ninh. + /Irrad. non dil.	/Ninh. + /Irrad. dil. 10^{-1}	Titre N non ml x 10^9	Titre coli W ml x 10^8	F test (1+3) et 4	F test (2+3) et 5
Exp. I	118 20,7 17,6%	I	14,8	156 17,4 11,1%	110 12,9 11,7%	3,6	2,8	32	187
2	400 29 7,3%	I	59 6,7 11,3	555 20,85 3,77	275 18,73 6,8%	3,2	2,3	4,9	470
3	143 16,9 11,8%	0,6	217 40,07 18,4%	675 64,8 9,6%	788 45,34 5,75%	3,2	1,4	73	347
4	193 7,68 3,98%	25	275 4,69 1,7%	755 90 12%	428 31,12 7,27%	4,4	9,3	49	60
5	95 8,66 9,16%	9,8	7,6	124 5,83 4,7%	23,6	2,6	5,5	5,5	3,3
6	203 14,07 6,94%	19	510 181,64 35,6%	1715 88,72 5,17%	1050 62,25 5,93%	1,6	5,7	95	30
7	90 9,94 11,1%	7,2	2400 333,22 13,8%	2760 543,67 19,71%	2930 127,77 4,36%	2	4,4	1,6	8
8	24,8	5,6	960 212,5 22,5%	1160 239,16 20,6%	3165 182,13 5,76%	2,2	2,4	1,2	247
9	32,4	4,8	2020 85,37 4,22%	4325 367,55 8,5%	3110 210 6,76%	2,2	5	144	768

significatives à 99 p. 100. Seules les expériences 7 (signif. stat. : 95 p. 100) et 5 n'atteignent pas cette sécurité. Les essais de réactivation homologue au moyen de phage ninhydriné ont donné des résultats trop irréguliers pour que nous puissions en faire état.

Nous avons précédemment montré, en utilisant le bactério-

phage ϕ T issu par mutation du ϕ N et capable de se développer en milieu trypaflaviné [2], que, dans le cas de la réactivation multiple hétérologue et à condition que le bactériophage formolé soit du ϕ T, le bactériophage irradié pouvait indifféremment être du ϕ T ou du ϕ N, sans modifier sensiblement le rendement en plages. Nous avons pu faire des constatations analogues avec le phage ϕ T ninhydriné.

Les résultats sont exposés au tableau VII.

TABLEAU VII.

	T Ninh. + N Irrad.	T Nigh. + T Irrad.	N Ninh. + T Irrad.	N Ninh. + N Irrad.	T Ninh.	T Irrad.	N Ninh.	N Irrad.
Exp. I	370 47,6 12,8%	320 44,5 13,8%	34 5,6 16,6%	0,2 - -	150 25,5 17%	9,8 - -	0 - -	0 - -
2	225 33 14,7%	200 7,1 3,6%	39,8 8 20%	0 - -	145 14,7 10,1%	6,4 - -	0 - -	0 - -
3	640 76,4 11,9%	940 146 15,5%	20,4 - -	0,2 - -	330 17,8 5,4%	19,4 - -	0 - -	0 - -
4	1340 66 4,9%	2070 233 11,2%	40,4 5,2 13,1%	1,8 - -	880 60 6,8%	19 - -	0 0 -	0 0 -
5	1750 587 35,5%	1155 116 10,1%	685 41 6%	0,8 - -	270 2 0,77%	4 - -	0 - -	0 - -

Les quatre mélanges suivants sont titrés selon la technique habituelle.

A. Volumes égaux de phage ϕ T ninhydriné dilué à 10^{-2} et de phage ϕ N irradié dilué à 10^{-1} .

B. Volumes égaux de phage ϕ T ninhydriné dilué à 10^{-2} et de phage ϕ T irradié dilué à 10^{-1} .

C. Volumes égaux de phage ϕ N ninhydriné dilué à 10^{-2} et de phage ϕ T irradié dilué à 10^{-1} .

D. Volumes égaux de phage ϕ N ninhydriné dilué à 10^{-2} et de phage ϕ N irradié dilué à 10^{-1} .

De plus les deux phages ϕ T et ϕ N, ninhydrinés ou irradiés, sont, à titre de témoins, titrés isolément.

Tous ces titrages ont été pratiqués en milieu trypaflaviné.

CONCLUSIONS.

1° Tout comme le phage ϕ N formolé, le phage ϕ N partiellement inactivé par la ninhydrine est réactivable par le phage ϕ N partiellement inactivé par les rayons ultra-violets.

2° La température à laquelle s'opère le contact entre le phage partiellement inactivé par le formol et les germes correspondants influe sur le rendement en plages. Le contact à basse température augmente nettement le rendement.

3° Le séjour à 42° pendant une heure trente des boîtes de Petri contenant, en milieu gélosé, les germes ayant fixé le phage partiellement inactivé par le formol augmente le rendement en plages, par rapport aux boîtes séjournant de façon continue à 37°.

Par combinaison des deux effets, on obtient un rendement optimum.

SUMMARY

MULTIPLICITY REACTIVATION OF BACTERIOPHAGE INACTVATED BY PHYSICAL AND CHEMICAL AGENTS.

1. Phage partially inactivated by ninhydrin can be reactivated, in multiple infection experiments, by the use of phage partially inactivated by ultraviolet radiation.

2. The number of plaques resulting from mixtures of bacterial cells and the corresponding phage partially inactivated by formaldehyde, in ratios ensuring single infection, is influenced by the temperature. Low temperature (0°) increases the number of plaques in comparison with the usual technique of keeping the suspensions of phage and cells at 38°.

3. The number of plaques resulting from the same mixtures is increased by keeping the agar plates at 42° for 1 h. 30, incubating them afterwards at the usual temperature of 37°5.

A combination of the two treatments, e. g. : contact in liquid medium at 0°, ulterior treatment in agar medium at 42°, yields the most efficient results.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MUTSAARS (W.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 1.
- [2] MUTSAARS (W.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 754.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e)

Séance du 6 novembre 1958.

Présidence de M. PRÉVOT.

COMMUNICATIONS

UN NOUVEAU SÉROTYPE DE *SALMONELLA*

par L. LE MINOR, R. NÉEL, B. DELAGE et D. DRÉAN.

(Instituts Pasteur de Paris, Tanger et Casablanca)

Cette souche a été isolée à Tanger de matières fécales d'une tortue terrestre (*Testudo graeca* Linné 1758) au cours de recherches sur la fréquence des *Salmonella* chez les animaux à sang froid du Maroc. Elle ne possède pas d'uréase, ne cultive pas sur milieu de Braun au CNK, a une lysine-décarboxylase. Elle fait fermenter en un jour : xylose, arabinose, rhamnose, glucose (+ gaz), mannitol, sorbitol, dulcitol, maltose, tréhalose, glycérol (en milieu de Stern), D-tartrate de sodium (milieu de Kauffmann). Le milieu au sorbitol est acidifié en quatre jours, ceux contenant adonitol, lactose, saccharose, inositol, salicine ne sont pas modifiés. La culture est abondante sur milieu de Simmons au citrate de Na. Cette *Salmonella* ne liquéfie pas la gélatine (technique de Kohn, modifiée par Lautrop), ne produit pas d'indole, donne sur milieu de Clark et Lubs une réaction au rouge de méthyle positive et une réaction de Voges-Proskauer négative. La production d'H₂S est abondante.

Sur lames la culture est agglutinée par les sérums O : 13,22, 1,13,23 et 23 saturé et H : γ ,1,6 et 6 saturé. En tube elle est agglutinée à 1/800 par les sérums anti-O : 1,2 et 1,3,19.

La saturation du sérum 1,13,23 préparé avec *S. worthington* fait baisser le titre de 1/1 600 à 1/400, celle du sérum γ préparé avec *S. mikawasima* de 1/25 600 à 1/100. La saturation du sérum 1,6 préparé avec *S. london* est totale.

Nous remercions le Dr Kauffmann qui a bien voulu confirmer cette formule antigénique.

RÉSUMÉ. — Description d'un nouveau sérotype de *Salmonella*, *S. tanger*, isolé de tortue et de formule 1,13,23 : γ : 1,6.

SUMMARY

A NEW *Salmonella* SEROTYPE.

Description of a new *Salmonella* serotype, *S. tanger*, isolated from a tortoise and possessing the formula : 1,13,23 : γ : 1,6.

TROIS NOUVEAUX SÉROTYPES DE SALMONELLA

L. LE MINOR, H. DARRASSE et Ch. CHARIÉ-MARSAINES.

(Institut Pasteur de Paris et Faculté de Médecine de Dakar)

Ces souches ont été isolées à Dakar (A. O. F.). Elles ne possèdent pas d'uréase, ne cultivent pas sur milieu de Braun au CNK, ont une lysine-décarboxylase. Elles font fermenter en vingt-quatre heures : xylose, arabinose, rhamnose, glucose (+ gaz), mannitol, sorbitol, dulcitol, maltose, tréhalose, font virer au violet le milieu au glycérol de Stern, cultivent sur milieu de Simmons au citrate de Na. Les milieux contenant : adonitol, lactose, saccharose et salicine ne sont pas acidifiés. Le D-tartrate de Na est fermenté en un jour. Elle produisent de l'H₂S, ne donnent pas d'indole. En milieu de Clark et Lubs, la réaction du rouge de méthyle est positive, celle de Voges-Proskauer est négative. La gélatine n'est pas liquéfiée (méthode de Kohn modifiée par Lautrop).

S. ouakam (9) 46 : z_{29} : —. Ce sérotype a été trouvé une fois dans de l'eau de citerne et trois fois chez des lézards (*Agama agama savatieri*). Il fait fermenter l'inositol. Sur lames il est agglutiné par les sérums anti-O : (9) 46 et 3,10 (on connaît les rapports entre les souches du groupe D₂ et celles du groupe E du schéma de Kauffmann-White : une agglutination dans les sérums 9 et 3,10 permet de suspecter immédiatement une *Salmonella* du groupe D₂). Agglutinée au titre homologue par un sérum (9) 46 préparé avec *S. strasbourg*, *S. ouakam* en sature les agglutinines. Ce sérotype est agglutiné sur lames par le sérum z_{29} qui, sur boîte de Sven-Gard, immobilise la culture. Cette souche est donc monophasique. La saturation du sérum z_{29} préparé avec *S. tennessee* fait baisser le titre homologue de 1/25 600 à 1/1 600.

S. camberene 35 : z_{10} : 1,5. Ce sérotype a été rencontré chez un lézard. L'inositol est fermenté.

Les saturations du sérum O : 35 préparé avec *S. adelaide* et du sérum z_{10} préparé avec *S. glostrup* sont totales. Au contraire, celle du sérum anti-1,5 préparé avec *S. kunzendorf* fait seulement baisser le titre homologue de 1/25 600 à 1/800.

S. yoff 38 : $z_4 z_{23}$: 1,2. Cette souche a été isolée d'un lézard. Elle ne fermente pas l'inositol. Si les saturations des sérums anti-O : 38 préparé avec *S. invernass* et 1,2 préparé avec *S. typhi murium* sont totales, celle du sérum anti- $z_4 z_{23}$ préparé avec *S. cerro* fait baisser le titre de 1/25 600 à 1/800. Ce sérum saturé agglutine à 1/800 *S. tallahassee* ($z_4 z_{32}$) mais n'agglutine plus *S. dusseldorf* ($z_4 z_{24}$).

Nous remercions le Dr Kauffmann d'avoir bien voulu confirmer ces formules antigéniques.

RÉSUMÉ. — Description de trois nouveaux sérotypes de *Salmonella* isolés à Dakar d'eau de citerne et de lézards : *S. ouakam* (9) 46 : z_{29} : —, *S. camberene* 35 : z_{10} : 1,5 et *S. yoff* 38 : $z_4 z_{23}$: 1,2.

SUMMARY

THREE NEW *Salmonella* SEROTYPES.

Description of three new *Salmonella* serotypes, isolated at Dakar from a water-tank and from lizards : *S. ouakam* (9) 46 : z_{29} : —, *S. camberene* 35 : z_{10} : 1,5 and *S. yoff* 38 : $z_4 z_{23}$: 1,2.

OBSERVATION CONCERNANT LE ROLE PROBABLE D'UN PRÉDATEUR DANS LA TRANSMISSION D'UN BACILLE AUX CHENILLES DE *PIERIS BRASSICAE*

par C. TOUMANOFF.

(Institut Pasteur)

Au cours de ces dernières années une invasion massive par *Pieris brassicae* d'un jardin potager (dont 4 m² étaient cultivés en choux de Bruxelles) nous a été signalée aux environs de Paris.

Cette invasion atteignait 30 pieds de choux à raison d'une population d'environ 40 à 50 chenilles par pied, ce qui dénotait une affection très grave.

Les chenilles provenant de ce jardin ont servi pour des expériences de laboratoire avec diverses souches de bactéries aérobies sporogènes et notamment : *Bacillus cereus* var. *alesti*, *B. cereus* var. *thuringiensis* et *B. cereus* var. *sotto*.

Ces expériences ont démontré que c'est *B. cereus* var. *alesti* qui s'avère le plus pathogène pour les chenilles de *Pieris brassicae* soumises à l'infection *per os*.

Il s'est trouvé qu'à cette époque nous avions au laboratoire des chenilles de *Pieris brassicae* d'une autre origine, fortement infestées par les *Apanteles* que nous avons rapportées à l'espèce *Apanteles glomeratus* L., parasite banal mais non exclusif de la piéride du chou.

Nous avons pu ainsi avoir à notre disposition 44 femelles de cet insecte que nous avons décidé de lâcher dans le carré de chou du jardin potager infesté par les chenilles de *Pieris*, après avoir mis ces prédateurs en contact avec une culture sporulée de *Bacillus cereus* var. *alesti*.

Les parasites étaient introduits dans les tubes contenant des cultures sporulées âgées de 6 à 8 jours.

Nous n'avons eu aucune mortalité parmi les prédateurs qui ont séjourné dans les tubes de culture pendant douze heures, bien que leur corps et leur tarière aient été souillés par la culture bactérienne.

Les *Apanteles* ont été ensuite replacées dans des tubes propres et mises en liberté, au nombre de 40 femelles, dans le carré infesté du jardin potager (1). Quatre femelles ont été laissées au laboratoire dans le tube de culture et y sont restées vivantes pendant plusieurs jours.

La mortalité des chenilles infestant les choux a commencé au bout de quatre ou cinq jours et s'est poursuivie ensuite pendant trois semaines.

De toutes manières, au bout d'un mois, tous les choux étaient débarrassés des piérides, et le germe utilisé a été isolé d'un des cadavres de chenilles.

Nous considérons qu'il est bien difficile d'expliquer ce résultat autrement que par la transmission mécanique des bactéries aux chenilles par les *Apanteles*.

Rappelons que cette forme de transmission mécanique des bactéries par la tarière souillée des hyménoptères prédateurs a déjà été observée par Metalnikov et Chorine (1926), qui ont étudié des épizooties mortelles chez *Galleria melonella* dont les élevages contenaient un braconide : *Dibrachys cavus*.

Nous avons depuis reproduit avec succès les expériences de Metalnikov et Chorine.

D'autre part, nous croyons que le même braconide fut responsable de la transmission d'un protozoaire pathogène pour *Galleria*, décrit sous le nom de *Caelogregarina ephestiae* et que nous n'avons trouvé que dans les élevages de *Galleria melonella* et *Achroea grisella* envahis par *Dibrachys cavus*.

Il nous semble ainsi que l'infection microbienne des larves de Lépidoptères peut se faire par les prédateurs, et l'étude de la possibilité de leur utilisation en tant que vecteurs passifs et mécaniques des bactéries se pose au premier plan des recherches pour la lutte bactériologique contre les chenilles nuisibles à l'agriculture.

(1) Nous devons la réalisation de cet essai sur le terrain à M. F. Le Goff, propriétaire de ce jardin à qui nous exprimons nos remerciements.

SUMMARY

OBSERVATION ON THE PROBABLE RÔLE PLAID BY A PREDATOR
IN THE TRANSMISSION OF A BACILLUS TO *Pieris brassicae* LARVAE.

The predators *Apanteles glomeratus* L. were brought in contact with a culture of *Bacillus cereus* var. *alesti* Toum. and Vago, and then liberated in a kitchen garden infested by cabbage worms (*Pieris brassicae* L.).

The mortality of *Pieris brassicae* caterpillars started in this small garden 4 to 5 days after introduction of the parasites and they had all died one month later.

The bacillus used has been isolated from a dead caterpillar of this garden. It is probable that the mortality among the cabbage worms, in this observation, has been due to mechanical transmission of bacilli by *Apanteles glomeratus* L.

BIBLIOGRAPHIE

- METALNIKOV (S.) et CHORINE (V.). *C. R. Acad. Sci.*, 1926, **182**, 729.
TOUMANOFF (C.). *Rev. franç. Apicult.*, janvier 1950.

UTILISATION DES HÉMATIES HYPERFORMOLÉES EN VIROLOGIE

II. — MISE AU POINT D'UN COMPLEXE VIRUS-HÉMATIES
DE LONGUE CONSERVATION, UTILISABLE POUR LE DIAGNOSTIC DES OREILLONS
PAR UNE MÉTHODE D'INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION SIMPLIFIÉE

par B. FAUCONNIER.

(Institut Pasteur, Centre National de la Grippe
[Service de M. R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE])

Une note récemment publiée [1] concernant la méthode de préparation d'hématies de coq hyperformolées, méthode mise au point à la suite des travaux de Flick [2] et de Cox et Pirtle [3, 4] sur les hématies d'homme et de mouton, laissait entrevoir une large utilisation de ces hématies dans de nombreux domaines grâce à leur extrême solidité.

L'hémagglutinine du virus ourlien, comme l'ont montré Cabasso [5], Sohler et Esser [6], se conserve bien : ce pouvoir hémagglutinant, propre à certaines souches (V. C. R., B. O. S., Enders), peut rester inchangé pendant des semaines et même des mois quand le virus est conservé à + 4° C dans certains milieux, tels que la solution tamponnée de Salk, le glycocolle, ou la glycérine tamponnée de Lépine [7].

L'association d'hématies résistantes et d'hémagglutinines ourliennes de bonne conservation conduit à la fabrication d'un complexe virus-hématies stable, qui peut être utilisé à tout moment pour titrer, au moyen de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination, les anticorps d'un sérum. Il suffit pour cela de définir exactement les proportions voulues de chacun des deux constituants, ainsi que le milieu de suspension commun, et d'en vérifier la valeur dans le temps par des essais périodiques. Ces faits sont exposés dans la note présente, et les résultats enregistrés après deux mois de conservation sont très satisfaisants.

MATÉRIEL UTILISÉ. — 1° *Hématies hyperformolées oxycarbonées* : H. F. co. — La fabrication de ces hématies a été exposée en détail par ailleurs [4]. Rappelons brièvement qu'il s'agit d'hématies de coq traitées deux fois de suite par des doses importantes de formol suivant la technique de Cox pour les hématies de mouton. Mais avant chaque traitement les hématies subissent une intense imprégnation à l'oxyde de carbone (gaz de ville), si bien qu'elles apparaissent rouges et non pas noirâtres à la fin du traitement au formol. Ainsi traitées, les hématies formolées oxycarbonées sont soigneusement contrôlées quant à leur capacité d'être agglutinées par le virus ourlien et à leur aptitude à sédimenter parfaitement en l'absence de virus. Les hématies sont alors réparties en tubes à raison de 1 ml de culot globulaire par unité, et conservées à +4° C.

2° *Virus ourlien*. — Il s'agit de la souche B. O. S. (Sohier) entretenue par passage sur œuf embryonné. Le virus est inoculé par voie allantoïque à des œufs embryonnés de 8 jours. Le liquide allantoïque virulent est prélevé après six jours d'incubation à 35° C. C'est le liquide allantoïque lui-même qui est utilisé.

3° *Liquides de dilution*. — Nous avons essayé deux milieux conservateurs. Ils ont donné des résultats identiques. Le premier est constitué par le tampon utilisé par Cox pour la conservation des hématies formolées. Sa composition est la suivante : NaCl, 0,137 M ; Na₂HPO₄, 0,01 M ; KH₂PO₄ 0,003 M.

Le second milieu est essentiellement formé par de la glycérine qui entre en proportion importante dans la composition finale de l'antigène concentré, suivant une formule qui sera précisée plus loin.

PRÉPARATION DE L'ANTIGÈNE : HÉMATIES FORMOLÉES-VIRUS. — Le virus ourlien fraîchement prélevé est titré en présence d'une suspension à 0,5 p. 100 d'H. F. co. La dilution représentant 8 unités hémagglutinantes par millilitre est déterminée avec précision. Si l'on suppose que le titre du liquide est de 320, on aura 8 unités hémagglutinantes en diluant le virus au 1/40. L'antigène : hématies (0,5 p. 100) + virus (8 unités) pour un volume de 400 ml, est constitué de la manière suivante et ceci pour l'emploi immédiat :

Liquide allantoïque virulent	10 ml
Hématies formolées	2 ml
Eau physiologique tamponnée	388 ml

Pour être conservé, l'antigène est concentré vingt fois, on a donc :

Liquide allantoïque virulent	10 ml
Hématies formolées	2 ml
Eau physiologique tamponnée ou glycérine	8 ml

L'antigène concentré est mis en ampoules à raison de 1 ml de suspension par ampoule. Les ampoules scellées sont conservées à +4° C. Chaque ampoule peut donner, par dilution en eau physiologique tamponnée, 20 ml d'antigène, soit 40 tubes de titrage suivant la méthode simple décrite plus bas.

Bien entendu, si le titre du virus est différent de 320, les proportions respectives des différents constituants de l'antigène concentré varient.

Ainsi, pour un titre de	640	1 280
	—	—
Liquide allantoïque	10 ml	10 ml
Hématies formolées	4 ml	8 ml
Eau physiologique tamponnée	6 ml	2 ml
A diluer	40 fois	80 fois

RECHERCHE DES ANTICORPS OURLIENS PAR L'ÉPREUVE D'INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION AU MOYEN DE L'ANTIGÈNE VIRUS-HÉMATIES. — Cette épreuve est particulièrement simple en regard de l'épreuve classique. Il suffit, en effet, de diluer le sérum de demi en demi à partir du 1/20, de manière à avoir 0,5 ml de dilution dans tous les tubes.

L'antigène hématies-virus concentré et conservé en ampoules scellées est alors dilué au taux voulu (suivant fabrication) et distribué dans tous les tubes à raison de 0,5 ml de suspension par tube, sans oublier le tube témoin qui ne contient pas de sérum mais 0,5 ml d'eau physiologique.

L'opération est presque instantanée et ne nécessite ni titrage préliminaire de l'antigène, ni préparation d'hématies fraîches comme dans la technique classique.

Après deux heures de sédimentation à la température du laboratoire, la lecture se fait de la même manière que pour l'épreuve classique : le tube témoin doit présenter une hémagglutination franche. Dans les premiers tubes de la réaction, l'inhibition de l'hémagglutination est d'autant plus forte que le sérum contient un taux plus élevé d'anticorps.

Il est à noter que les différents constituants contenus dans chaque tube sont en proportion égale à ceux enregistrés dans la technique classique : virus, 4 unités hémagglutinantes ; hématies, 0,5 p. 100.

RÉSULTATS OBTENUS DANS LE TEMPS. — Les premiers essais pratiqués avec les antigènes hématies-virus concentrés ont montré, après deux mois de conservation à +4° C en ampoules scellées, que le taux des anticorps détectés dans un sérum était strictement semblable à celui des anticorps titrés au moyen du même antigène éprouvé le jour de sa fabrication.

Les épreuves ont été pratiquées avec des sérums de convalescents ainsi qu'avec des sérums d'individus normaux.

Ces mêmes sérums serviront dans l'avenir à éprouver le même antigène-hématies pour savoir dans quelle mesure il peut se conserver au-delà de quelques mois.

Les résultats très satisfaisants obtenus deux mois après fabrication nous incitent à penser que la conservation sera suffisamment prolongée (plusieurs mois) pour qu'on puisse envisager de fabriquer de tels antigènes et de les mettre à la disposition de laboratoires de ville pour le diagnostic sérologique des oreillons par le test de Hirst. Ce test, particulièrement rebutant à cause de sa complexité même (nécessité de virus frais, d'hématies fraîches, de titrages délicats et peu familiers aux techniciens de sérologie classique), cesserait d'être l'apanage des laboratoires hautement spécialisés pour devenir accessible, par sa simplicité, aux laboratoires de biologie médicale courante.

RÉSUMÉ. — L'emploi d'un complexe virus ourlien-hématies formolées de longue conservation pour la recherche des anticorps anti-oreillons par une méthode d'inhibition de l'hémagglutination simplifiée a donné toute satisfaction deux mois après la fabrication de ce complexe. Les résultats permettent d'envisager la préparation d'un antigène stable, facilement utilisable par les laboratoires de biologie médicale courante.

SUMMARY

USE OF HYPERFORMOLIZED ERYTHROCYTES IN VIROLOGY.

PREPARATION OF A VIRUS-ERYTHROCYTES COMPLEX WHICH CAN BE PRESERVED FOR A LONG TIME AND USED FOR THE DIAGNOSIS OF MUMPS, BY MEANS OF A SIMPLIFIED HEMAGGLUTINATION-INHIBITION TEST.

Two months after its preparation, a mumps virus-formolized erythrocytes complex has been used with success for the demonstration of mumps antibodies by means of a simplified hemagglutination-inhibition test. These findings suggest the possibility of preparing a stable antigen for routine laboratory purposes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FAUCONNIER (B.). *Ann. Inst. Pasteur* (sous presse).
- [2] FLICK (J. A.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1948, **68**, 448.
- [3] COX (C. D.) et PIRTLE (E. D.) *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1956, **93**, 373.
- [4] COX (C. D.). *J. Lab. Clin. Med.*, 1956, **48**, 298.
- [5] CABASSO (V. J.), MARKHAM (F. S.) et COX (H.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1951, **78**, 791.
- [6] SOHIER (R.) et ESSER-TRIMBERGER (I.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 696.
- [7] LÉPINE (P.). In *Les ultravirus des maladies humaines*, par C. Levaditi et P. Lépigne. Maloine, édit., Paris, 1948, 1630.

UNE ENQUÊTE HUMORALE CHEZ LES PSYCHOPATHES. ANALYSE STATISTIQUE DES RÉSULTATS OBTENUS

par F. MILHAUD, C. CHATAGNON (*), M. SANDOR et G. SANDOR.

(Institut Pasteur et Hôpital de Maison-Blanche,
Service du Dr CHATAGNON)

G. Sandor et C. Chatagnon ont déjà relaté, dans une courte note [1], qu'une forte proportion des schizophrènes et des psychopathes à intellect affaibli présentent de l'hyper-gamma-globulinémie, alors que chez les psychopathes en crise d'angoisse ce sont au contraire les hyper-alpha-globulinémies qui prédominent. M. F. Milhaud a bien voulu soumettre à une analyse statistique ces conclusions basées uniquement sur l'étude de la répartition proportionnelle.

Rappelons que nous avons étudié 213 psychopathes (de sexe féminin) qui se sont répartis suivant les types humoraux comme suit (tableau I) :

TABLEAU I. — Distribution proportionnelle des perturbations humorales entre divers groupes de psychopathes.

	Nombre de cas:	Nombre d'un type normal	type humoral hyper-alpha	p.100 de cas totaux hyper-gamma
Sujets normaux	27	61	11	8
Psychoses variées (psychose hallucinatoire chronique, comitialité, psychasthénie etc.)	36	61	1	22
Psychopathes présentant des lésions somatiques	43	25,5	53,5	21
Psychopathes avec crise d'angoisse	27	27	53,5	19,5
Affaiblissement de l'intellect (sénilité et présénilité, psychose paranoïde, débiles et arriérés, paralysie générale)...	24	46	4	50
Schizophrènes	54	37	11	52

L'analyse statistique a donné, de son côté, les résultats résumés dans le tableau II.

Les différences entre les sérums de malades classés comme atteints de psychoses variées (psychose hallucinatoire chronique, maniaco-dépressive sans crise d'angoisse, état confusionnel catatonique, comitialité avec troubles du caractère, psychasthéniques, etc.) et les sérums normaux peuvent donc être fortuites. Il faut retenir la notion d'une fréquence élevée des cas d'hyper-alpha-globulinémie et des cas d'hyper-gamma-globulinémie chez les psychopathes porteurs de lésions somatiques ou en crise d'angoisse. Il faut retenir seulement la notion d'une

(*) Chargée de recherches à l'Institut national d'Hygiène.

TABLEAU II. — Analyse statistique de la répartition des perturbations humorales dans divers groupes de psychopathes.

Perturbations par rapport au sérum de sujets sains:		Perturbation globale	Perturbation concernant la fréquence des hyper-alpha-globulinémies	Perturbation concernant la fréquence des hyper-gamma-globulinémies
Nombre de degrés de liberté:		2	1	1
<u>1) Psychoses variées:</u>	χ^2			
conclusion	3,2 non significatif	0,4 non significatif	1,9 non significatif
<u>2) Psychose + lésion somatique:</u>	χ^2			
conclusion	21,5 significatif	20,4 significatif	7,6 significatif
<u>3) Psychopathes avec crise d'angoisse:</u>	χ^2			
conclusion	22,1 significatif	21 significatif	8,9 significatif
<u>4) Psychopathes avec affaiblissement de l'intellect:</u>	χ^2			
conclusion	11,7 significatif	0,1 non significatif	6,6 significatif
<u>5) Schizophrènes:</u>	χ^2			
conclusion	17,8 significatif	7,6 non significatif	16,4 significatif

fréquence élevée des cas d'hyper-gamma-globulinémie chez ceux présentant un déficit intellectuel et chez les schizophrènes.

Il n'a été possible de trouver ici de différence au point de vue de la fréquence des hyper-alpha-globulinémies ou des hyper-gamma-globulinémies :

1° Ni entre les malades porteurs de lésions somatiques et les anxieux (2 degrés de liberté, $\chi^2 = 2,1$, non significatif) ;

2° Ni entre les malades atteints de déficit intellectuel et les schizophrènes (2 degrés de liberté, $\chi^2 = 2,1$, non significatif) ;

En résumé, nous ne pouvons pas isoler le fait d'une corrélation entre l'angoisse et l'hyper-alpha-globulinémie pour en envisager une explication. L'angoisse s'accompagne souvent d'hyper-alpha-globulinémie, mais aussi d'hyper-gamma-globulinémie. Quant à l'existence d'une hyper-gamma-globulinémie chez les psychopathes à intellect affaibli et les schizophrènes, elle est statistiquement assurée. Aussi, notre conclusion primitive reste, à leur sujet, entièrement valable. On pourrait éventuellement rechercher la raison de l'augmentation du taux des gamma-globulines chez eux dans l'état d'indifférence qui les caractérise.

RÉSUMÉ. — L'analyse statistique de la répartition des perturbations humorales découvre une corrélation indiscutable entre l'hyper-gamma-globulinémie, d'une part, et l'affaiblissement de l'intellect ou la schizophrénie, d'autre part. L'état d'angoisse provoque de même des modifications des proportions globuliniques et bien que chez la majorité des angoissés on rencontre de l'hyper-alpha-globulinémie, la fré-

quence des hyper-gamma-globulinémies semble être aussi plus élevée chez eux que chez les sujets normaux.

SUMMARY

A HUMORAL INQUIRY INTO PSYCHOPATHIC DISEASES. STATISTICAL ANALYSIS OF THE FINDINGS.

Statistical analysis of the distribution of humoral troubles demonstrates an unquestionable relationship between hyper-gamma-globulinemia on the one hand, and feeble-mindedness or schizophrenia on the other hand. A state of anguish also induces alteration of the globulin proportions. Most patients suffering from anguish have hyper-alpha-globulinemia, but it seems that they also have more frequently hyper-gamma-globulinemia than normal individuals.

BIBLIOGRAPHIE

[4] SANDOR (G.) et CHATAGNON (C.). *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1958, **142**, 487.

ACTION DE L'ISONIAZIDE SUR *NOCARDIA ASTEROIDES* IN VITRO ET IN VIVO

par Maria DOBEK (*).

(Institut Pasteur, Service de Mycologie, Paris)

Les Actinomycètes, qui sont, on le sait, des bactéries filamenteuses, sont en général peu sensibles aux antibiotiques antibactériens ; ils ne sont pas sensibles aux antibiotiques antifongiques. L'emploi de l'INH a permis dans certains cas [4, 5, 6, 7, 8, 9] d'obtenir des résultats intéressants dans l'actinomycose à germe anaérobie. Dans cette note, nous étudions l'action de l'INH sur *Nocardia asteroides* qui, du point de vue des lésions cliniques et histo-pathologiques, du pouvoir pathogène, semble très proches des genres *Actinobacterium* et *Mycobacterium*.

ACTIVITÉ DE L'INH *in vitro*. — L'étude de l'activité anti-actinomycète de l'INH a été entreprise sur 9 souches de *N. asteroides* (collection Service de Mycologie de l'Institut Pasteur). Les souches sont cultivées en milieu synthétique liquide (PO_4KH_2 : 0,45 g ; $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, 12 H_2O : 1,19 g ; SO_4Mg , 7 H_2O : 0,60 g ; ClK : 1 g ; asparagine : 1 g ; glucose : 10 g ; solution oligo-dynamique : X gouttes ; thiamine : 10^{-7} ; acide

(*) Boursière du Gouvernement français. Adresse actuelle : Poznan, Grunwaldska, 36, Pologne.

nicotinique : 10^{-7} ; pyridoxine : 10^{-7} ; pantothénate de Ca : 10^{-7} ; biotine : 10^{-9} ; eau distillée : 1 000 ml ; pH 6,8) contenant de l'INH à doses croissantes comprises entre 10 et 5 000 $\mu\text{g/ml}$. Ce milieu est réparti à raison de 10 ml par tube et stérilisé (110° pendant trente minutes). Trois tubes de chacune des concentrations d'INH sont ensemencés avec 1 goutte d'une culture de 10 jours, bien homogénéisée. Les cultures sont incubées à 30° et les résultats sont lus après dix, vingt et trente jours ; ils sont résumés dans le tableau I

TABLEAU I. — Inhibition partielle ou totale de la croissance de 9 souches de *Nocardia asteroides*.

	Souches expérimentées de <i>Nocardia asteroides</i>								
	318	320	322	328	331	333	349*	358	360
Doses d'INH donnant une inhibition partielle (en $\mu\text{g/ml}$)	1250	40	1250	2500	625	312	80	1250	2500
Doses d'INH donnant une inhibition totale (en $\mu\text{g/ml}$)	5000	2500	5000	5000	2500	2500	156	5000	5000

* Cette souche, 349, n'appartient probablement pas à l'espèce.

Les souches étudiées ne sont sensibles qu'à de fortes concentrations d'INH (1 250 à 5 000 $\mu\text{g/ml}$). Une seule d'entre elles est totalement inhibée par la dose plus faible de 156 $\mu\text{g/ml}$, encore est-ce une souche qui, probablement, n'appartient pas à l'espèce *N. asteroides*. Les concentrations partiellement inhibitrices varient selon les souches ; elles sont comprises entre 40 et 1 250 $\mu\text{g/ml}$. L'inhibition de la croissance est plus nette après trente jours qu'après dix ou vingt jours d'étuve.

Waksman et Lechevalier [10] ont obtenu des résultats comparables en étudiant l'activité de l'INH sur de nombreuses Actinomycétales. Ils concluent que les *Nocardia* sont moins sensibles que les *Mycobactéries* et les *Streptomyces*. Par ailleurs, nous observons une inhibition totale à des concentrations plus élevées que celles qui sont rapportées par Mac Vay et Spunt [9] et qui varient entre 8 et 800 $\mu\text{g/ml}$.

ACTIVITÉ CATALASIQUE. — L'activité catalasique des bacilles tuberculeux est liée à leur sensibilité à l'INH et à leur pouvoir pathogène. Afin d'étudier l'activité catalasique des diverses souches de *N. asteroides*, nous avons, sur une lame porte-objet, broyé un fragment (diamètre $\pm 0,5$ cm) d'une culture d'un mois dans 1 goutte de réactif (H_2O_2 : 15 p. 100 ; Tween 80 : 1 p. 100 dans l'eau distillée). On a été ainsi à même de constater que toutes les souches étudiées étaient fortement catalase-positives sans qu'il y ait entre elles de différences significatives.

En expérimentant avec des cultures d'âges différents, nous avons constaté que, si toutes les souches restent catalase-positives, les cultures

âgées d'une semaine ont, d'une façon générale, une activité catalasique plus élevée que les cultures de 1 à 3 mois et surtout que celles âgées de 1 an. Ces résultats devraient se confirmer par les méthodes quantitatives.

Les cultures sur les divers milieux (gélose ordinaire, gélose glucosée de Sabouraud, Loewenstein-Jensen, milieu à la pomme de terre, milieu synthétique liquide) n'apportent aucune modification du pouvoir catalasique des souches étudiées.

Boenicke a observé [4] que les souches de *Mycobacterium tuberculosis*, sensibles à l'INH et catalase-positives, deviennent catalase-négatives lorsqu'on les rend résistantes à de fortes concentrations d'isoniazide (100 µg/ml). Au contraire, les Mycobactéries, qui n'appartiennent pas à l'espèce *M. tuberculosis* (Mycobactéries saprophytes, aviaires, ou « atypiques », pathogènes ou non), et qui sont toutes d'emblée plus ou moins résistantes à l'INH, restent catalase-positives lorsqu'on les rend résistantes à des taux considérables d'INH, de l'ordre de 1 000 µg/ml.

Dans cet ordre d'idées, nous avons voulu connaître l'influence de l'INH sur l'activité catalasique de nos diverses souches de *N. asteroides*. Nous n'avons noté aucune différence entre l'activité catalasique des cultures maintenues six semaines au contact de 1 250 µg/ml d'INH et celle des cultures témoins sans INH. On peut donc conclure que le comportement de nos cultures est le même que celui qu'avait noté Boenicke pour les Mycobactéries saprophytes ou atypiques.

ACTIVITÉ DE L'INH *in vivo*. — L'étude de l'action de l'INH sur la nocardiose expérimentale a été effectuée sur 60 souris inoculées par voie intrapéritonéale avec les souches de *Nocardia asteroides* (54 animaux) ou avec de l'eau physiologique (6 animaux témoins). Un premier lot de 30 animaux a reçu une injection quotidienne sous-cutanée (solution stérile d'INH à 0,05 µg/ml) ; le second lot groupait les animaux non traités. Après sept, quatorze et vingt et un jours, 10 souris de chaque lot ont été sacrifiées. Lors de l'autopsie, des rétrocultures d'organes (poumons, rate, foie, reins, péritoine) ont été effectuées sur Loewenstein-Jensen et incubées à 30°.

Les résultats de cette expérience montrent que le pouvoir pathogène varie suivant les souches : 4 d'entre elles (318, 322, 328, 358) sont très pathogènes et ce sont celles qui sont moins sensibles à l'action de l'INH. Deux souches (320, 333) sont moyennement pathogènes, une (349) l'est très faiblement et deux (331, 360) ne le sont pas du tout.

L'INH n'a aucune action sur le cours de la maladie expérimentale ni sur les actinomycètes présents dans les organes, qui se développent aussi bien après une, deux ou trois semaines de traitement. Il est en revanche intéressant de noter qu'il existe une certaine corrélation entre le pouvoir pathogène des souches et leur sensibilité relative à l'INH *in vitro*. Les souches qui ont le plus grand pouvoir pathogène sont moins sensibles que celles à faible pouvoir pathogène.

RÉSUMÉ. — Les souches de *Nocardia asteroides* en expériences sont totalement inhibées par des concentrations d'INH très élevées (2 500

à 5 000 $\mu\text{g/ml}$). L'une d'elles cependant, qui diffère de l'espèce type, est totalement inhibée par 156 $\mu\text{g/ml}$ d'isoniazide. Les doses partiellement inhibitrices varient selon les souches entre 40 et 2 500 $\mu\text{g/ml}$. L'inhibition de la croissance est plus nette après trente jours qu'après dix ou vingt jours.

L'INH n'a aucune action sur le cours de la nocardiose expérimentale ni sur les actinomycètes présents dans les organes. On note une corrélation entre le pouvoir pathogène des souches (pouvoir qui varie suivant les souches) et la sensibilité *in vitro* de celles-ci à l'INH.

Toutes les souches de *N. asteroides* étudiées sont catalase-positives ; les cultures les plus âgées sont les moins actives. L'influence des différents milieux de culture sur l'activité catalasique est nulle.

On n'observe pas de perte de l'activité catalasique des souches cultivées en présence d'INH. Cet Actinomycète se comporte donc là comme les Mycobactéries saprophytes ou atypiques.

SUMMARY

ACTION OF ISONIAZID ON *Nocardia asteroides* *in vitro* AND *in vivo*.

The strains studied are completely inhibited by high concentrations of isoniazid (2 500 to 5 000 $\mu\text{g/ml}$). However, one strain, different from the type species, is completely inhibited by 156 $\mu\text{g/ml}$. The partially inhibiting concentrations vary according to the strains between 40 and 2 500 $\mu\text{g/ml}$.

Isoniazid does not influence the course of experimental nocardiosis, nor *Actinomyces* present in the organs. There is a relationship between the pathogenicity of the strains and their sensitivity to isoniazid.

All the strains studied are catalase-positive. The oldest cultures are the less active. The different culture media have no influence.

No loss of catalase activity has been noticed in strains grown in the presence of isoniazid. *N. asteroides* has then the same comportment as saprophytic or atypic *Mycobacteria*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ADAMSKI (J.), BARANCZAK (L.), DOBEK (M.) et KRAMNIK (J.). *Czas. Stomat.*, 1955, **18**, 12.
- [2] ADAMSKI (J.) et DOBEK (M.). *Bull. Soc. Amis Sci. et Lettres de Poznan*, 1955, série I, n° 5, 4.
- [3] BANERJEE (A. K.), SEN (G. P.) et NAUDI (P.). *Lancet*, 1954, **266**, 1299.
- [4] BOENICKE (R.). *Bull. Union Intern. contre Tub.*, 1957, **28**, 151.
- [5] BORKOWSKAYA (V. Y.). *Probl. Tub.*, 1955, **1**, 48.
- [6] CANTONI (O.) et MOLINARI (P.). *Atti Soc. ital. Sci. veter.*, 1953, **7**, 788.
- [7] GRACIANSKI (P. de) et GRUPPER (Ch.). *Bull. Soc. franç. Derm. Syph.*, 1953, **1**, 454.
- [8] KUDEJKO (J.). *Pol. Tyg. Lek.*, 1955, **10**, 719.
- [9] MAC VAY (L. V.) et SPUNT (D. H.). *J. amer. med. Assoc.*, 1953, **153**, 95.
- [10] WAKSMAN (S. A.) et LECHEVALIER (H. A.). *Am. Rev. Tub.*, 1953, **67**, 261.

RELATION ENTRE L'ACTIVITÉ RESPIRATOIRE ET LA BIOSYNTHÈSE DE LA CHLOROTÉTRACYCLINE CHEZ *STREPTOMYCES AUREOFACIENS*

par Vera HRIBALOVA et Jiri STARKA.

(Département de Microbiologie, Université Charles, Prague)

Parmi les facteurs qui influencent la biosynthèse de la chlorotétracycline (CTC) par *Streptomyces aureofaciens*, les deux plus importants sont l'aération de la culture et la concentration en phosphates. Les premières observations sur les effets de l'aération sont celles de Matejlova et coll. [1], qui ont signalé que l'arrêt de l'aération au cours des trente premières heures, même pendant une durée très brève, diminue fortement la production de CTC par la culture. Ce phénomène est à rapprocher du comportement des *Acetobacter*, chez qui l'arrêt transitoire de l'aération en cours de développement a pour effet de diminuer considérablement la quantité finale d'acide acétique produit [2].

En ce qui concerne les phosphates, Biffi et coll. [3] ont montré que, lorsque leur concentration dépasse un certain seuil, ils inhibent la production de CTC. Suivant Di Marco et coll. [4], cet effet des ions phosphates s'expliquerait par une relation étroite entre la biosynthèse de la CTC et le catabolisme des glucides. Ces auteurs ont constaté que dans les milieux où la glycolyse est inhibée et le cycle des pentoses corrélativement favorisé, par des inhibiteurs spécifiques, la biosynthèse de la CTC augmente. Au contraire, l'inhibition spécifique du cycle des pentoses diminue la biosynthèse de la CTC et a également pour effet de réduire la croissance totale, d'accroître la quantité de saccharose consommée et enfin d'entraîner une accumulation d'acide pyruvique. Les phosphates agiraient par un mécanisme analogue et se comporteraient comme des inhibiteurs spécifiques du cycle des pentoses.

Ces observations nous ont conduits à rechercher si les effets de l'aération sur la biosynthèse de la CTC ne sont pas du même ordre et ne s'accompagnent pas de modifications profondes portant sur les activités respiratoires et le métabolisme général.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — La souche B-MK de *S. aureofaciens* utilisée au cours de ce travail nous a été aimablement communiquée par l'Institut de Recherche des Antibiotiques de Rožtoky, près de Prague. L'organisme a été cultivé en cultures submergées, dans un milieu semblable à celui de Minieri et coll. [5] :

Saccharose	40,0 g	K ₂ Cr ₂ O ₇	0,06 mg
CaCO ₃	1,0 g	Acide acétique glacial ...	0,5 ml
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,25 g	Citrate de sodium	2,0 g
KH ₂ PO ₄	0,05 g	NaCl	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,05 g	Eau distillée	q. s. p. 1 litre
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,3 g	pH ajusté à 6,8, stérilisation à 120°, pendant	
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	0,04 g	trrente minutes.	
MnSO ₄ , 4 H ₂ O	0,01 g		

La concentration en phosphates de ce milieu (0,1 mg/ml) est celle qui s'est avérée optima et permet d'obtenir des teneurs finales en CTC atteignant 400 $\mu\text{g/ml}$. Les cultures ont été incubées à $28^\circ (\pm 2^\circ)$ dans des ballons de 500 ml, contenant chacun 60 ml de milieu. L'aération était assurée par un agitateur à secousses réglé au rythme de 96 oscillations par minute.

La CTC a été dosée suivant Levine [6] par colorimétrie à 440 $m\mu$, en utilisant un colorimètre Spekker (Hilger).

Les activités respiratoires ont, dans tous les cas, été déterminées avec

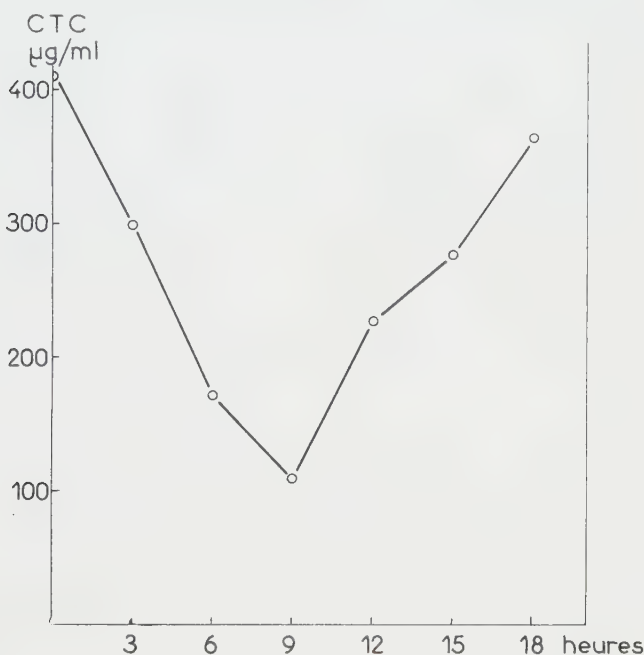


FIG. 1. — Formation de la CTC dans les cultures de *S. aureofaciens* soumises à des arrêts périodiques de l'aération. — Les points expérimentaux représentent le poids total de ce composé synthétisé en soixante-douze heures. L'âge des cellules au moment où l'on arrête pour la première fois l'agitation est figuré en abscisses. Le temps 0 correspond à la production d'une culture aérée sans interruption (témoin).

le mycélium âgé de 30 heures, lavé dans de l'eau distillée et mis en suspension homogène dans du tampon phosphate M/15 à pH 6,8. La consommation d'oxygène a été mesurée par la méthode manométrique directe de Warburg à 28° , dans des systèmes contenant comme substrat du saccharose 0,066 M.

RÉSULTATS. — Afin de déterminer la période du développement des cultures où l'arrêt de l'aération a le plus d'influence sur la biosynthèse de la CTC, l'agitation a été interrompue dix minutes par heure pendant six heures consécutives, en commençant ces arrêts trois, six,

neuf, douze, quinze ou dix-huit heures après le début de l'incubation. On a constaté que ces arrêts de l'aération forcée ne modifient pas, quelle que soit la période de l'incubation où on les commence, le poids sec de mycélium obtenu à la fin des expériences, c'est-à-dire à la soixante-douzième heure. D'autre part, l'effet inhibiteur sur la biosynthèse de la CTC est maximum lorsque les arrêts périodiques de l'agitation sont commencés à la neuvième heure de l'incubation (fig. 1). Dans ce cas, la quantité finale de CTC est réduite de 71 p. 100 par rapport aux témoins dans lesquels l'aération n'est jamais interrompue.

Pour comparer l'activité respiratoire des cellules développées en aération continue à celle des cellules développées en aération interrompue, on a employé, d'une part le mycélium des cultures témoins, et d'autre part le mycélium de cultures ayant subi des arrêts périodiques de l'agitation de la neuvième à la quinzième heure. Dans les deux cas, le mycélium a été récolté au bout de trente heures de développement, moment où nous avons constaté que la vitesse de formation de la CTC est maxima. D'autre part, l'activité respiratoire des deux types de mycélium a été déterminée en l'absence et en présence de chacun des inhibiteurs suivants :

Azothydrate de sodium (N_3Na)	2.10^{-3} M	Arséniate de Na	10^{-4} M
Malonate de sodium .	2.10^{-2} M	Fluorure de Na	2.10^{-2} M
<i>p</i> - chloromercuriben- zoate de Na	4.10^{-5} M	Hydroxylamine	2.10^{-2} M
2,4-dinitrophénol	2.10^{-4} M	<i>p</i> -quinone	3.10^{-4} M
Mono-iodacétamide ...	3.10^{-3} M	Pyrophosphate de Na.	3.10^{-2} M
		Chlorhydrate de phé- nylhydrazine	$2,5.10^{-2}$ M

Dans ces conditions, on n'a constaté aucune inhibition de l'activité respiratoire par l'azothydrate de soude, le *p*-chloromercuribenzoate et le malonate de soude. La mono-iodacétamide, l'hydroxylamine et la *p*-quinone inhibent complètement la respiration des deux types de mycélium. Un dernier groupe d'inhibiteurs (tableau I) agit différemment à l'égard de chacun des deux types de mycélium considérés. C'est ainsi que l'arséniate inhibe davantage la respiration des cultures témoins, tandis que le pyrophosphate, le fluorure et la phénylhydrazine inhibent davantage la respiration du mycélium provenant des cultures qui ont subi les arrêts d'aération.

TABLEAU I. — Action de quelques inhibiteurs sur l'activité respiratoire.

Inhibiteurs	% d'inhibition	
	Mycélium cultivé en aération continue	Mycélium cultivé en aération discontinue
Arséniate de sodium	61	82
Pyrophosphate de sodium	80	39
Fluorure de sodium	22	0
Phénylhydrazine	75	45

DISCUSSION. — Les résultats de ces expériences appuient l'hypothèse initiale suivant laquelle l'interruption, même brève, de l'aération au cours du développement de *S. aureofaciens* entraîne chez cet organisme un « shift » métabolique irréversible. Différents auteurs ont publié des faits tendant à indiquer que les *Streptomyces* pourraient dégrader alternativement les glucides, soit par le processus de la glycolyse, soit par l'intermédiaire du cycle des pentoses. Il est actuellement établi que le sédoheptulose phosphate, ou une autre étape du cycle des pentoses, est le précurseur commun des composés aromatiques et, de ce fait, on peut supposer que la biosynthèse de la CTC est spécifiquement et directement inhibée par les inhibiteurs agissant sur le cycle des pentoses. Les inhibiteurs que nous avons employés ne sont pas suffisamment spécifiques pour que nous puissions tirer de nos observations des conclusions formelles à ce sujet et pour qu'on puisse tenir pour certain que les organismes capables de synthétiser la CTC se distinguent des autres par une utilisation préférentielle ou exclusive du cycle des pentoses.

Quoi qu'il en soit, les différences que nous avons relevées en ce qui concerne le comportement des deux types de mycélium à l'égard des inhibiteurs sont suffisantes pour qu'on puisse conclure que l'arrêt temporaire de l'aération entraîne un remaniement non seulement quantitatif mais encore qualitatif des activités métaboliques. Une analyse plus approfondie des systèmes enzymatiques intéressés est actuellement en cours.

RÉSUMÉ. — Les arrêts temporaires de l'aération au cours du développement des cultures diminuent considérablement la formation de chlorotétracycline par *Streptomyces aureofaciens*.

Si l'on compare les activités respiratoires du mycélium « aéré » et du mycélium ayant subi des arrêts de l'aération, on constate que ces deux types d'organismes se comportent différemment à l'égard des inhibiteurs classiques de la glycolyse et du cycle des pentoses. Le « shift » métabolique observé est permanent et irréversible.

SUMMARY

RELATIONSHIP BETWEEN RESPIRATORY ACTIVITIES AND BIOSYNTHESIS OF CHLORTETRACYCLINE IN *Streptomyces aureofaciens*.

Short interruptions of aeration during cultivation reduce to a considerable extent the biosynthesis of chlortetracycline by *Streptomyces aureofaciens*. When the respiratory activities of continuously aerated mycelium were compared to those of mycelium from cultures with discontinued aeration, it was stated that the two different types of cells behaved differently towards classical inhibitors of glycolysis and of the pentose cycle. The observed metabolic shift is permanent and non-reversible.

★
★ ★

Nous tenons à exprimer notre vive gratitude au Groupe de Microbiologie du Vyzkumny Ustav Antibiotik (Roztoky u Prahy) pour ses

conseils et son aide au cours de ce travail. Nous remercions également le Dr J.-C. Senez, du Centre National de la Recherche Scientifique, qui a bien voulu revoir notre texte.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MATELOVA (V.), MUSILKOVA (M.), NECASEK (J.) et SMEJKAL (F.). *Preslia*, 1955, **27**, 27.
- [2] HROMATKA (O.). *Chem. Ztg*, 1952, **76**, 776.
- [3] BIFFI (G.), BORETTI (G.), DI MARCO (A.) et PENNELLA (P.). *Appl. Microbiol.*, 1954, **2**, 228.
- [4] DI MARCO (A.), BORETTI (G.), JULITA (P.) et PENNELLA (P.). *Rev. Ferment. Indus. Aliment.*, 1956, **41**, 140.
- [5] MINIERI (P. P.), SOKOL (H.) et MELVIN (C.). Brevet U. S. P., n° 2.734.018, 1956.
- [6] LEVINE (J.), GARLOCK (E. A. Jr) et FISCHBACH (H.). *J. Am. Pharm. Assoc.*, 1949, **38**, 473.
- [7] SRINIVASAN (P. R.), SPRINSON (D. B.), KALAN (E. B.) et DAVIS (B. D.). *J. biol. Chem.*, 1956, **223**, 913.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoires* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

L'action des antibiotiques sur des souches de *Bacillus larvae* White d'origine géographique différente, par C. TOUMANOFF et L. MALMANCHE.

Le taux de croissance des bactéries du sol en fonction de la source énergétique. Etude et conséquences, par J. AUGIER.

Données expérimentales sur la phényracylline et son association avec la dihydrostreptomycine, par A. LUTZ.

Sur la fréquence des différents virus entériques isolés au cours de l'année 1957, par J. MAURIN, M^{mes} J. VIRAT et M.-C. CARRÉ.

Culture du virus de la vaccine. II. Culture du virus sur cellules épithéliales de rein de veau en couche monocellulaire, par P. SUREAU et E. R. BRYGOO. —

Détoxication du sérum anti-virus de Carré équin obtenu par injection d'organes virulents de furet, par F. YEU et P. RECLARD.

Effet de l'instillation conjonctivale de virus grippal chez le lapin et chez la souris, par Cl. HANNOUN.

Sur le pouvoir pathogène de certaines souches de vibrions habituellement considérées comme saprophytes, par H. JACOTOT, J. LEVADITI et A. VALLÉE.

Croissance et toxinogénèse diphtériques en culture agitée, par M. RAYNAUD, J. ALOUF et R. MANGALO.

Recherches immunologiques sur le facteur activateur de la polyarthrite chronique évolutive, par G. MOUSTARDIER, Ch. DULONG DE ROSNAY et P. DU PASQUIER.

Les facteurs anti-globuliniques au cours de la polyarthrite chronique évolutive et dans les immunsérums anti-bactériens, par A. EYQUEM, N. GUYOT-JEANNIN et L. PODLIACHOUK.

Etude immuno-électrophorétique des rhumatismes inflammatoires chroniques, par J. C. FRANCO, A. EYQUEM et L. PODLIACHOUK.

ÉLECTIONS

M^{mes} Ephrussi-Taylor, Lajudie, M^{lle} Roche, MM. Audrin, Ben Hamida, Chany, Depoux, Dommergues, Heuls, Netter, Orio, Ribéreau-Gayon, Rivière, Villemot sont élus membres de la Société Française de Microbiologie.

LIVRES REÇUS

Les problèmes actuels posés par les endocardites malignes. Rapports présentés au XXXI^e Congrès Français de Médecine, Paris, 1957. 1 vol., 212 p., 11 fig. Prix : 2 200 fr.

Il s'agit, avec les endocardites malignes, d'affections connues depuis fort longtemps, mais dont les caractères cliniques et évolutifs ont été grandement modifiés depuis l'introduction des antibiotiques.

Tous les rapports insistent sur la plus grande fréquence actuelle des endocardites ulcéro-végétantes, sur la difficulté de guérison de certaines endocardites lentes, sur les récides possibles et sur le fait que la guérison clinique par les antibiotiques est loin d'être toujours une guérison définitive.

Le rapport entre les lésions purement infectieuses, septicémiques, la possibilité de manifestations rhumatismales ou plus simplement allergiques, l'existence de lésions vasculaires anévrismales, sont l'objet de nombreuses discussions. Le problème des endocardites malignes à hémoculture négative pose celui de la technique des hémocultures. Plusieurs études sont consacrées au côté biologique, montrant l'intérêt du laboratoire à la fois dans le diagnostic et dans la conduite du traitement.

H. T.

R. J. Block, E. L. Durrum et G. Zweig. — *A manual of paper chromatography and paper electrophoresis.* 2^e édit., 1 vol., 710 p., Academic Press Inc., New York, 1958.

Tous les biochimistes qui utilisent la chromatographie sur papier se réjouiront de voir paraître cette seconde édition d'un ouvrage indispensable à leur travail. Restant dans l'esprit de la première édition,

ce livre sacrifie les exposés théoriques et les tableaux de résultats à la description des techniques et complète ainsi heureusement, dans sa première partie, le livre de E. et M. Lederer qui a été conçu plutôt dans l'autre sens. On y retrouve les chapitres de la première édition, mais considérablement allongés, particulièrement dans la première partie qui traite de la chromatographie. C'est ainsi que, par exemple, les méthodes générales voient leur chapitre passer de 33 à 61 pages, que le chapitre des sucres passe de 30 à 45 pages et qu'apparaissent même de nouveaux chapitres, tels que celui traitant des pigments naturels.

L. L.

E. Baldwin. — *Dynamic aspects of biochemistry*. 3^e édit., 1 vol., 526 p., Cambridge University Press, 1957.

Dans cette nouvelle édition l'auteur s'est efforcé de conserver à son livre le caractère didactique qu'il a toujours eu, puisqu'il l'a conçu pour des étudiants en biochimie et pour servir de base de connaissance aux médecins et aux chimistes qui veulent aborder l'étude du métabolisme cellulaire.

Les divisions des deux autres éditions ont été conservées : *Première partie* : Enzymes, propriétés générales. Nature des processus catalytiques, énergétiques, biologiques ; hydrolases et enzymes d'adaptation ; enzymes de transfert et d'isomérisation ; enzymes d'oxydation ; systèmes de déshydrogénases. Dans la *deuxième partie* traitant du métabolisme, on retrouve les 11 chapitres anciens portant sur les méthodes, la digestion et l'absorption des substances nutritives, le métabolisme des protéines et des acides aminés, le métabolisme des bases puriques et de leurs dérivés, le métabolisme des hydrates de carbone et des graisses. Un chapitre spécial a été ajouté sur la production de sucre chez les plantes vertes.

Par son excellente mise à jour et sa présentation, ce livre est le document de base nécessaire à tous ceux qui veulent s'initier au métabolisme cellulaire.

L. L.

A. Tarnoky. — *Clinical biochemical methods*. 1 vol., 239 p., Hilger et Watts Ltd, Londres, édit.

Il s'agit d'un recueil de fiches établies par un homme qui a journellement réalisé ces dosages à l'hôpital de Reading. Il contient une centaine de techniques détaillées de biochimie clinique, parmi lesquelles je relève au hasard : réserve alcaline du plasma ; amylase dans le plasma et l'urine ; bilirubine dans le sérum ; chlorure dans l'urine ; cholestérol dans le sérum ; test de tolérance à l'insuline ; PAS dans le sang ; rapport sodium-potassium dans la salive, trypsine dans le liquide duodénal.

L. L.

B. Gözsy et L. Kato. — *Studies on phagocytic stimulation*. 1 vol., 136 p., Thérion frères, édit., Montréal (Canada), 1957.

Trois parties. Les deux premières constituent un exposé didactique que les auteurs mettent à profit pour brosser, de la cinétique de la réaction inflammatoire (du moins, des modifications vasculaires qu'elle

comporte), un tableau enrichi par les données les plus récentes. Une place de choix, naturellement, est donnée aux médiateurs chimiques : histamine, polypeptides, 5 hydroxytryptamine. La troisième partie est le résumé des recherches (*in vivo* et *in vitro*) que Gözsy et Kato ont consacrées à l'influence exercée par des essences naturelles ou des produits synthétiques voisins sur le pouvoir phagocytaire des divers éléments du S. R. E. Eléveraient nettement ce pouvoir : le guajazulène, l'acétate de citronellol et de linalol, enfin, le D-limonène. Mode d'action encore mal précisé ; en tout cas, il ne semble pas faire intervenir une libération d'histamine ou de 5-hydroxytryptamine.

A. D.

A. Grumbach et W. Kikuth. — *Les maladies infectieuses de l'homme et leurs agents pathogènes*. 2 vol., G. Thieme, édit., Stuttgart, 1958.

Cet ouvrage de deux volumes de 1 600 pages, édité sous la direction des professeurs A. Grumbach et W. Kikuth, avec la collaboration de savants allemands et suisses et du professeur Benedek, de Chicago, pour la mycologie, et du Dr S. Gard, de Stockholm pour les maladies à virus du système nerveux central, est consacré aux maladies infectieuses de l'homme, provoquées par les bactéries, les rickettsies, les virus, les champignons, les protozoaires et les helminthes. Il a été conçu surtout comme précis du point de vue du microbiologiste des maladies infectieuses et, pour cette raison, sont traitées l'épidémiologie, la pathogénie et la prophylaxie de ces maladies. Il s'adresse d'une part à l'étudiant pour l'accompagner comme livre de référence, pendant ses études et le début de sa carrière médicale et, d'autre part, au médecin clinicien dans le but de le familiariser avec les idées modernes de la microbiologie. C'est pour cette raison que la partie des maladies infectieuses proprement dites est précédée d'une partie générale de 411 pages, dans laquelle sont traités les rapports de l'hôte et du parasite, les généralités sur les agents pathogènes, l'épidémiologie générale, l'immunisation active et passive, les bases de la chimiothérapie, la désinfection et la stérilisation. Chaque chapitre de la partie générale et spéciale est suivi d'une importante bibliographie, ce qui rend le livre précieux et augmente son intérêt. Le microbiologiste peut y trouver aussi l'essentiel des idées qui dirigent actuellement les recherches dans différentes branches de la microbiologie pure et appliquée à l'étiologie et la prophylaxie des maladies infectieuses.

J. G.

A. M. Walter. — *Neue Tuberkulostatika und Tuberkulostatika-Resistenz von Tuberkelbakterien*. Symposium de Fribourg-en-Brisgau, février 1958. 1 vol., 152 p., 81 fig., G. Thieme, édit., Stuttgart, 1958. Prix : D. M. 19,80.

Au cours du Symposium de Fribourg, la discussion a porté d'une part sur des thèmes généraux : étude expérimentale des nouveaux médicaments (rapport de B. Fust), étude clinique de nouveaux médicaments (rapport de G. Berg), problème de la persistance des germes sensibles après chimiothérapie prolongée (rapport de G. Canetti),

d'autre part sur des thèmes spéciaux : mesure de la résistance à la viomycine, à la cyclosérine et au pyrazinamide (G. Meissner), étude expérimentale de la viomycine (Krodolfer), du pyrazinamide (G. Daddi), de la cyclosérine (B. Fust), étude clinique des mêmes médicaments (Tanner, Brecke et Wentz, Daddi, Heilmeyer, etc.). Les rapports et les interventions constituent une somme de faits précis et nouveaux concernant non seulement les trois médicaments nouveaux étudiés plus particulièrement, mais les techniques d'examens des médicaments antibacillaires en général. Une fois de plus, il en ressort que l'apparition de la résistance bacillaire est à l'origine de la plupart des échecs de la chimiothérapie antituberculeuse. N. R.

A. Frappier et M. Panisset. — *La souche du BCG*. Monographie de l'Institut de Microbiologie et d'Hygiène de l'Université de Montréal. Préface du Dr L. Nègre. 1 vol., 120 p., Montréal, 1957.

Une cinquantaine de laboratoires, répartis dans le monde entier, préparent les suspensions vaccinales de BCG. Dans ces différents laboratoires, la souche originale n'est pas entretenue de façon rigoureusement identique et le vaccin lui-même n'est pas préparé partout de façon identique. Il n'est donc pas étonnant que les vaccins diffèrent parfois par leurs propriétés allergisantes ou par leur pouvoir pathogène local. Les auteurs recherchent si ces différences sont dues au mode de préparation du vaccin ou à la création de souches-filles nouvelles, différant génotypiquement de la souche originale. S'appuyant sur une très vaste bibliographie et sur une enquête personnelle, ils concluent que le plus souvent la souche originale n'a pas été modifiée. Jamais sa virulence n'a augmenté, mais dans quelques cas rares la souche a perdu une partie de son pouvoir allergisant, en même temps que son pouvoir pathogène local diminuait. C'est cette possibilité d'atténuation exagérée de la souche BCG qui rend nécessaire un contrôle constant des souches-filles, contrôle dont les auteurs étudient les modalités. N. R.